

**Untersuchungen zur strukturellen und funktionellen Plastizität
des 20S-Proteasoms der Maus
und seiner Modulierung durch den Proteasomaktivator PA28**

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

BIOCHEMIE

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. rer. nat. Ralf Stohwasser

geboren am 27.10. 1959 in Köln

Präsident: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Eingereicht am:

Gutachter:

1.

2.

STOHWASSER, RALF

Untersuchungen zur strukturellen und funktionellen Plastizität des 20S Proteasoms der Maus und seiner Modulation durch den Proteasomaktivator PA28

Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
Institut für Biochemie - Charité

Habilitationsschrift

94 Seiten, 218 Literaturzitate, 19 Abbildungen, 8 Tabellen

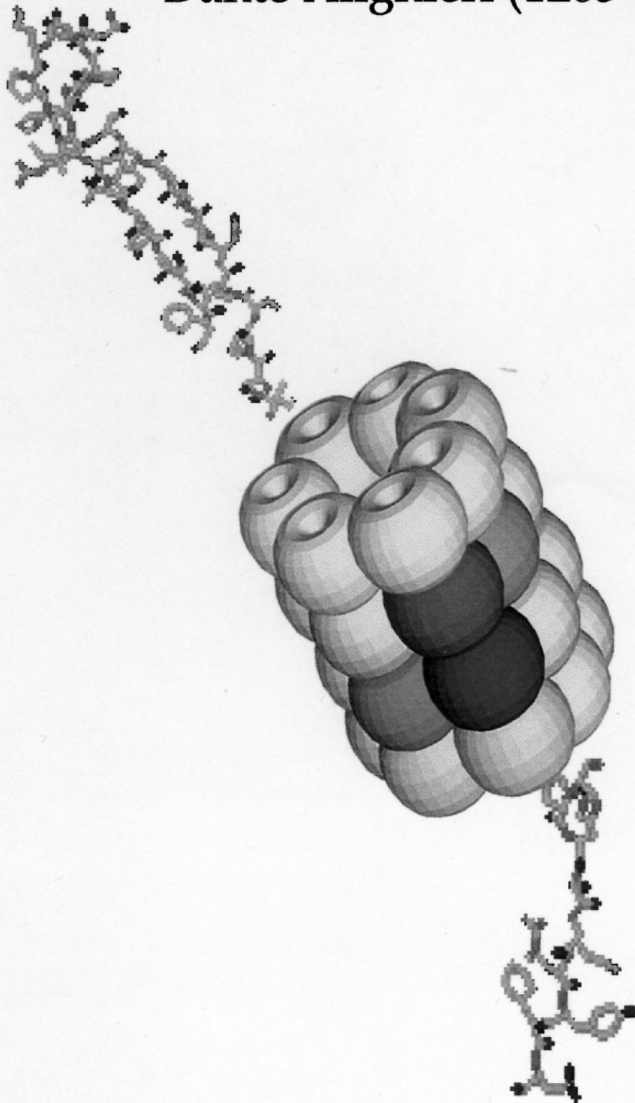
Die Studie beinhaltet eine biochemisch-molekularbiologische Analyse des 20S-Proteasoms und seiner Aktivierung durch Proteine der PA28-Familie. Das 20S-Proteasom ist die zentrale Epitop-prozessierende cytosolisch-nukleäre Protease des MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweges.

In Mikroglia, wie auch in anderen Zellen, unterliegt das Proteasom einer Interferon- γ -(IFN- γ)-vermittelten strukturellen Plastizität, d.h. einer Substitution der Untereinheiten der Aktiven Zentren. Durch diesen Austauschmechanismus werden proteolytische Schnittpräferenzen modifiziert, was für die Hierarchie von cytotoxischen T-Zellantworten von Bedeutung ist. Lipopolysaccharide (LPS) bewirken in Mikroglia ebenfalls Veränderungen der proteasomalen Zusammensetzung des 20S-Komplexes und seines PA700-Aktivators. Dies ist ein Hinweis auf die Rolle des Proteasoms auch bei der Prozessierung von Antigenen des endolysosomalen Antigenpräsentationsweges. Die Modulation der Zusammensetzung des 20S-Proteasoms in Mikroglia durch IFN- γ und LPS ist ein weiterer Beleg für die Rolle der Mikroglia bei der zellulären Immunantwort im Zentralnervensystem.

Funktionen des Proteasoms in der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation werden durch den Proteasomaktivator PA28 optimiert. Die PA28-Proteinfamilie besteht aus den Proteinen PA28 α , PA28 β und PA28 γ . Diese Studie trägt - basierend auf kinetischen Modellierungen, Mutagenese- und Protein-Protein-Interaktionsstudien und Untersuchungen zur MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation in PA28-Transfektanten - zur funktionellen Neubewertung dieser drei Proteine bei. Die drei PA28-Proteine sind autonome Aktivatoren des Proteasoms. Heteromere PA28 $\alpha\beta$ -Komplexe verursachen eine stärkere Aktivierung des Proteasoms als die homomeren PA28 α - oder PA28 β -Komplexe. Das PA28 γ -Protein ist in vitro ein schwacher Aktivator verschiedener proteasomaler Peptidaseaktivitäten, der dennoch in unserem in vivo-Modell eine verbesserte MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation bewirkt. Kinetische Argumente sprechen für Funktionen der PA28 α und PA28 β -Proteine als Translokasen für Peptidsubstate und -produkte des Proteasoms. Anhand des HBx-Proteins des Hepatitis B-Virus wird die Möglichkeit illustriert, das vorgestellte Modell zur Analyse viraler Faktoren anzuwenden, die mit der Aktivierung des Proteasoms durch PA28 interferieren.

**Ihr, die Ihr hier eintretet,
lasset alle Hoffnung fahren !**

Dante Alighieri (1265-1321)



	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	Seite
I.	DARSTELLUNG DER FORSCHUNGSERGEBNISSE	1 - 94
1.	EINLEITUNG	
1.1.	Einführung in die Thematik	1
1.2.	Der Ubiquitin-Proteasom-Weg des intrazellulären Proteinabbaus	1
1.3.	Der modulare Aufbau des proteasomalen Systems	3
1.4.	Proteasomale Proteolyse und MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation	5
1.5.	Mikroglia - eine immunologische Effektorzelle im ZNS	6
1.6.	Fragestellungen und Methodik	8
2.	ERGEBNISSE A: Zusammenfassung eigener Publikationen	10-17
2.1.	Zusammensetzung und Funktion des 20S-Proteasoms der Maus	10
2.1.1.	Identifizierung der Untereinheiten des Proteasoms der Maus [1; 2]: IFN- γ -induziert den Austausch von drei Proteasomuntereinheiten	10
2.1.2.	Charakterisierung der MC14- und MECL-1-spezifischen cDNAs	12
2.1.3.	Reziproke Expression von Proteasom- β -UE in Geweben der Maus	12
2.1.4.	Konsequenzen einer LMP7-Deletion in Knockout-Mäusen: Zusammensetzung und Peptidaseaktivitäten des 20S-Proteasoms [5]	14
2.1.5.	Strukturelle Plastizität des 20S-Proteasoms in Mikroglia der Maus [6].	15
2.1.5.1.	Nachweis von Immunoproteasomen in aktivierter Mikroglia	15
2.1.5.2.	Die strukturelle Plastizität von PA700 in Mikroglia	16
3.	ERGEBNISSE B: Ausführliche Darstellung unveröffentlichter Ergebnisse	18-52
3.1.	Funktionsanalyse der PA28 α - und PA28 β -Proteine	18
3.1.1.	Nachweis von PA28-20S-PA700 Komplexen in B8-Fibroblasten	18
3.1.2.	Überexpression von PA28 β und PA28 $\alpha\beta$ in B8-Fibroblasten	21
3.1.3.	Rekonstitution von PA28 Proteasom-Aktivator-Komplexen in vitro	23
3.1.4.	Assemblierungskinetiken der PA28 α -, PA28 β - und PA28 $\alpha\beta$ -Komplexe	25
3.1.5.	Translokationsmodell der Aktivierung des 20S-Proteasoms	27
3.1.6.	Prozessierung eines pp89-Epitops durch PA28-aktivierte Proteasomen	30
3.1.7.	Mutagenese des KEKE-Motivs der PA28 α -Untereinheit	32
3.1.8.	Aktivierung des 20S-Proteasoms durch PA28 $\alpha\Delta 70-91$	35
3.2.	Untersuchungen zur Funktion des PA28 γ -Proteins	37
3.2.1.	Funktionen von PA28 γ in der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation	37
3.2.2.	Expression rekombinanter PA28 γ -Proteine (recPA28 γ)	39
3.2.3.	Nachweis von PA28 γ im Nukleoplasma von RMA-Zellen	39
3.2.4.	Stabilität des PA28 γ -Proteins in B8-Fibroblasten	43
3.2.5.	Interaktionspartner des PA28 γ -Proteins	45

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.	Protein-Protein-Interaktionen proteasomaler Untereinheiten mit Proteinen des Proteasomaktivators PA28 und viralen Proteinen	47
3.3.1.	Die Proteasomuntereinheit $\alpha 4$ /MC6 interagiert mit PA28 α/β	47
3.3.2.	YTH-Interaktionsscreening mit PA28 α	49
3.3.3.	Interferenz des HBx-Proteins des Hepatitis B Virus (HBV) mit der Aktivierung des 20S-Proteasoms durch recPA28	51
4.	DISKUSSION	53-64
4.1.	Modulation des 20S-Proteasoms durch IFN- γ : Implikationen für die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation endogener Antigene	53
4.2.	Mikroglia als antigenpräsentierende Zelle des ZNS	56
4.2.1.	Cytokin-Netzwerke kontrollieren Mikrogliafunktionen	57
4.2.2.	LPS- und IFN- γ -induzierte Expression von Immunoproteasomen in Mikroglia	57
4.2.3.	Die Mikroglia und ihre Rolle bei viralen und bakteriellen Infektionen	58
4.3.	Die PA28-Proteinfamilie und ihre Rolle in der MHC-Klasse-I- Antigenprozessierung	59
4.4.	Mechanistische und kinetische Aspekte der Proteasomaktivierung	61
4.5.	Interferenz viraler Proteine mit der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation	63
4.6.	Schlußfolgerungen und Perspektiven	64
5.	MATERIAL UND METHODEN	65-81
5.1.	Klonierung von cDNAs in Plasmidvektoren	65
5.1.1.	DNA-Amplifikation durch die "Polymerase Chain reaction" (PCR)	65
5.2.	Etablierung eines Rekonstitutionssystems der Proteasomaktivierung	67
5.2.1.	Aufreinigung des 20S-Proteasoms aus Geweben und Zelllinien	67
5.2.2.	Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine	68
5.2.3.	Kinetische Modellierung der Aktivierung des 20S-Proteasoms	69
5.2.4.	Kinetik der Proteasomaktivierung: fluorogene Substrate	71
5.2.5.	Kinetik der Proteasomaktivierung: Inhibierung mit einem HBx-Peptid	71
5.2.6.	Statistische Methoden bei Modellierungen	73
5.2.7.	Kinetik der Proteasomaktivierung: synthetisches pp89-Peptidsubstrat	73
5.3.	Zellfraktionierung und Nukleoplasmapräparation	74
5.4.	Nachweis von PPI mit der "Yeast Two-Hybrid"-Methode	74
5.4.1.	Testprinzip des YTH-Systems	74
5.4.2.	Klonierungsvektoren: Eigenschaften von pAS2-1 und pACT-2	74
5.4.3.	Reportergenaktivierung	75
5.4.4.	Ausschluß von falschpositiven Interaktionen	75
5.4.5.	Nachweis der β -Galaktosidase-Reportergenaktivität	75

INHALTSVERZEICHNIS

5.5.	Nachweis von PPI mit der "FarWestern"-Methode	76
5.5.1.	Radioaktive Markierung von GST-Fusionsproteinen	76
5.5.2.	Renaturierung filtergebundener Proteine	77
5.5.3.	FarWestern-Bindungsassay	77
5.6.	Immunpräzipitationen und "pulse chase"-Experimente	78
5.6.1.	Basistechniken	78
5.6.2.	Spezielle Verfahrensweisen	78
5.7.	Etablierung von B8-mPA28 γ -Transfektanten	80
5.7.1.	Kultivierung von B8-Fibroblasten und B8-Transfektanten	80
5.7.2.	Transfektion von Calciumphosphat-DNA-Präzipitaten in B8-Zellen	80
5.7.3.	Durchflußzytometrische Analyse der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression	81
5.7.4.	Cytotoxischer-T-Lymphozyten-Test	81
6.	LITERATUR	82-94
6.1.	Eigenzitate	82
6.2.	Vollständige Literaturübersicht	83
II.	PUBLIKATIONEN ZU "2. ERGEBNISSE A"	
	[1] Biol. Chem. 377: 571-577	
	[2] Eur. J. Immunol. 26: 863-869	
	[3] Eur. J. Immunol. 27: 1182-1187	
	[4] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 8970-8975	
	[5] FEBS Lett. 383: 109-113	
	[6] GLIA, im Druck (Manuskript: 31 Seiten, 2 Tabellen, 3 Abbildungen)	
	[7] Biol. Chem. 380: 293-297 (Übersichtsartikel)	
III.	ANHANG	
7.1.	Verzeichnis der Tabellen	
7.2.	Verzeichnis der Abbildungen	
7.3.	Danksagungen	
7.4.	Erklärung	
IV.	ZUSAMMENFASSUNG	

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

AA	Acrylamid
AD	activation domain
AUF-1	AU binding factor 1
APC	antigen presenting cell
ATP	Adenosintriphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Bz	Benzoyl
CHTR	Chymotrypsin-ähnliche Peptidaseaktivität
DB	DNA binding domain
DEAE	Diethylaminoethyl
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescenc activated cell sorter
FPLC	fast protein, peptide and polynucleotid liquid chromatography
g	Erdbeschleunigung = 9.806 m/s^2
GAL4	Transkriptionsfaktor
GRB	growth factor receptor-bound protein
GRO α	mouse chemokine KC
GST	Glutathione-S-Transferase
HBV	Hepatitis B Virus
HIV	Humanpathogenes Immundefizienz Virus
HLA	human leukocyte antigen
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinyl-Ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
IFN	Interferon
IEP	isoelektrischer Punkt
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-Thio- β -galaktosid
JAK	Janus-Kinase
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
LMP	low molecular weight polypeptide
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCA	7-Amido-4-Methylcoumarin

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

MHC	major histocompatibility complex
βNa	β-Naphtylamid
NEPHGE	non-equilibrium pH gradient gel electrophoresis
OD	Optische Dichte
PA28	Proteasomaktivator (28 kDA)
PA700	Proteasomaktivator (700 kDA)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PGPH	Peptid-Glutamyl-Peptid hydrolysierende Peptidaseaktivität
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPI	Protein-Protein-Interaktion/en
RP-HPLC	reverse phase HPLC
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit, Sedimentationskonstante: 1 S=10 ⁻¹³ Sekunden
SDS	Sodium Dodecylsulfat
Suc-	Succinyl-
SOS	son of sevenless (signaltransduzierendes Protein)
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAP	transporter associated with antigen processing
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethyl-ethylendiamin
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tri-hydroxymethyl-aminomethan
TRYP	Trypsin-ähnliche Peptidaseaktivität
UAS	upstream activating sequences
Ub	Ubiquitin
UE	Untereinheit/en
YTH	yeast two-hybrid
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-Galaktopyranose
Z-	Benzyloxycarbonyl-
ZNS	Zentralnervensystem

* Zur Bezeichnung von Aminosäuren wurde der "one letter code" verwendet:

D, Aspartat; E, Glutamat; F, Phenylalanin; K, Lysin; N, Asparagin;

Q, Glutamin; R, Arginin; W, Tryptophan, Y, Tyrosin;

I. DARSTELLUNG DER FORSCHUNGSERGEBNISSE

1.1. Einführung in die Thematik

Die Akkumulation ubiquitiniert Proteine ist ein Charakteristikum zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen (Lewy Body Dementia, Pellisé et al., 1996; Morbus Huntington, Kalchmann et al., 1996). Mutationen in Proteinsubstraten oder Komponenten des proteolytischen Systems oder eine Überlastung der Faltungsmaschinerie der Zelle können die Stabilität von Proteinen verändern und sich in genannten pathologischen Phänomenen äußern (Schwartz & Ciechanover, 1999). Eine Entkopplung der Stabilitätskontrolle regulatorischer Proteine innerhalb von Zellzyklus und Apoptose liegt auch der Kanzerogenese zugrunde (Spataro et al., 1998, Seliger et al., 1998). Virale Pathogene können auf verschiedenen Ebenen mit der Immunantwort interferieren. Zu den viralen Persistenzmechanismen zählen proteolytische Mechanismen, die die Stabilität der MHC-Klasse-I-Moleküle beeinträchtigen. Die proteasomale Prozessierung antigener Peptide und der Transport dieser Peptide ins Endoplasmatische Retikulum (ER) sind Ziele viraler Intervention (Ehrlich et al., 1995; Ahn et al. 1997). Diese Beispiele illustrieren die medizinische Bedeutung der Erforschung proteolytischer Mechanismen. Untersuchungen, die dem Verständnis des Ubiquitin-Proteasomsystems und seiner molekularen Komponenten dienen, sind daher nicht nur aus Sicht der Grundlagenforschung sondern auch aus der Perspektive medizinischer Anwendungen von Interesse und sollen Thema dieser Abhandlung sein.

1.2. Der Ubiquitin-Proteasom-Weg des intrazellulären Proteinabbaus

Das Proteasom-Ubiquitin-System ist die zentrale Proteolysemaschinerie der Zelle (Ciechanover & Schwartz 1998). Die enzymatische Kaskade des Proteinabbaus über den Proteasom-Ubiquitinweg ist in Abb. 1 zusammengefaßt. Die Kaskade beginnt mit der ATP-abhängigen, kovalenten Ligation des Ubiquitins (8.5 kDa) über das carboxyterminale Gly76 an das Ubiquitinaktivierungsenzym E1 (Hershko & Ciechanover, 1998). Der aktivierte E1-Ubiquitin Thioester wird auf Ubiquitin-Konjugasen, ebenfalls in Thioesterbindung, übertragen. Zahlreiche Isoformen dieser E2-Enzyme besitzen Spezifität für unterschiedliche Proteinsubstrate und Interaktion mit Ubiquitin-Ligasen. Diese E3-Enzyme übertragen das E2-gebundene Ubiquitin auf Proteine, die der Degradation zugeführt werden sollen. Der Abbau der markierten Proteine wird von Proteasomkomplexen durchgeführt, die mit dem Proteasomaktivator PA700 ATP-abhängig assoziieren. Ein dritter Proteasekomplex aus 20S-Proteasom und PA28 entsteht ATP-unabhängig und prozessiert Peptide, jedoch keine größeren, gefalteten Proteine.

Das Ubiquitin-Proteasom-System erkennt und degradiert sowohl cytosolische und nukleäre Substrate, als auch Proteine, die in Plasma- und ER-Membranen integriert sind oder aus dem ER ins Cytosol reimportiert werden (Plemper & Wolf, 1999).

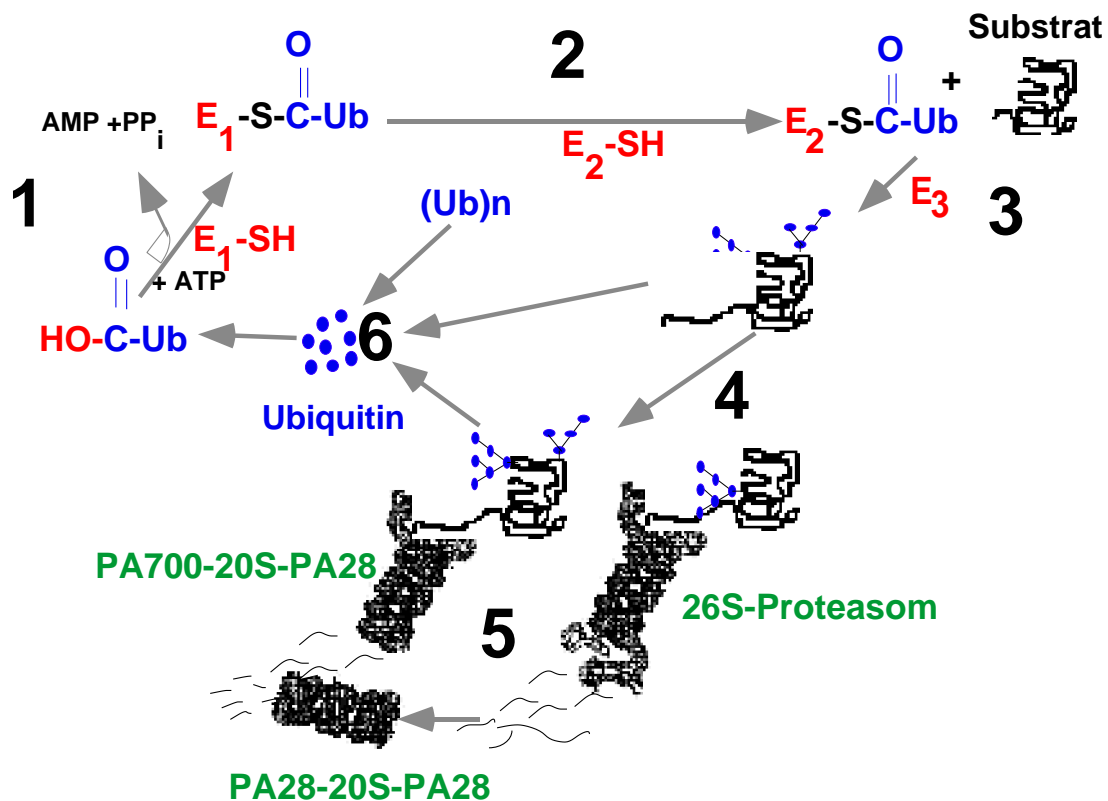


Abb. 1: Das Ubiquitin-Proteasom-System der Proteindegradation. (1) Ein Ubiquitin-Aktivierungsenzym (E1-SH) katalysiert die kovalente Ligation des Ubiquitinadenylat-Intermediates mit der Sulfhydrylgruppe eines Cys-Restes. (2) Das aktivierte Ubiquitin wird auf eine Ubiquitin-Konjugase (ca. 100 Isoformen; E2-SH) übertragen. (3) Ubiquitin-Protein-Ligasen (ebenfalls verschiedene Isoformen; E3): übertragen Ubiquitinreste von E2-Enzymen auf Proteinsubstrate. (4) Erkennung und Entfaltung Ub-markierter Proteine durch den Proteasomaktivator PA700. (5) Degradation der entfalteten Proteine durch das 20S Proteasom in Assoziation mit verschiedenen Proteasomaktivatoren (PA700, PA28). Die Proteasekomplexe sind als Konturdarstellung der Elektronendichte (Vorlage: Tanaka et al. 1997) graphisch montiert worden. (6) Ubiquitin-Hydrolasen (Deubiquitinasen; Isopeptidasen) kompletieren den intrazellulären Ubiquitinpool durch Abspaltung von Ubiquitin aus Polyubiquitinketten, von Peptidfragmenten und ubiquitinierten Proteinsubstraten.

Für den Mechanismus der Substraterkennung scheint die Signal-induzierte Phosphorylierung eine herausragende Bedeutung zu haben (Mykles, 1998). So werden einige Proteine durch spezifische Phosphorylierungen destabilisiert und für die Ubiquitinierung von spezifischen Kinasen vorbereitet. Schließlich können die auf diese Weise markierten Proteine durch das 26S-Proteasom (PA700-20S-PA700) oder durch eine - kürzlich von K. Hendil in Hela-Zellen nachgewiesene - PA700-20S-PA28-Protease zu Peptiden abgebaut werden (Hendil et al., 1998).

1.3. Der modulare Aufbau des proteasomalen Systems

Das eukaryontische 20S-Proteasom ist ein 700 kDa-Komplex, der aus 28 Untereinheiten (UE) aufgebaut ist (Abb. 2). Die Kristallstruktur des 20S-Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde erst kürzlich publiziert (E.C.3.4.99.46; Groll et al., 1997). Die 14 verschiedenen UE innerhalb eines 20S-Komplexes (21-31 kDa) weisen eine $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Stöchiometrie auf (Abb. 2 B) und werden zwei Proteinfamilien zugeordnet: sieben verschiedene α -Proteasomuntereinheiten (Abb. 2C) bilden die äußeren Ringe und damit die Interaktionsflächen für die regulatorischen Komplexe PA700 und PA28. Die beiden inneren Ringe bestehen aus β -UE (Abb. 2D). Die für die Hydrolyse der Peptidbindung notwendigen Nukleophile der verschiedenen aktiven Zentren werden von sechs aminoterminalen Threoninen - in Form ihrer Hydroxylgruppen - bereitgestellt. Die terminalen β 1-Thr-Reste der reifen β -UE entstehen durch autokatalytische Prozessierung der β -Proproteine während der Assemblierung des 20S-Proteasoms aus 13S- und 16S-Prekursorkomplexen (Schmidtke et al., 1997). Aufgrund des außergewöhnlichen Katalysemechanismus wird das Proteasom einer neuen Klasse von Proteasen, den aminoterminalen Threoninhydrolasen (Ntn-Hydrolasen) zugeordnet (Bochtler et al., 1999). Die sechs aktiven Zentren des 20S-Proteasoms liegen im Inneren der zentralen Reaktionskammer (84 nm^3), die von den β -Ringen gebildet wird. Die α - und β -Ringe umschließen jeweils noch eine kleinere Vorkammer von 59 nm^3 (Baumeister et al., 1998). Den aktiven Zentren lassen sich entsprechend ihrer präferenziellen Peptidaseaktivität Trypsin-ähnliche (TRYP), Caspase-ähnliche (PGPH; Peptid-Glutamyl-Peptid-hydrolysierend) oder Chymotrypsin-ähnliche (CHTR) Eigenschaften zuordnen. Diese Nomenklatur bezieht sich auf die basische, saure oder hydrophobe Qualität der P1-Aminosäure (Schechter & Berger, 1967). Der postulierte Reaktionsmechanismus des 20S-Proteasoms ist in der Legende zu Abb. 2 erläutert.

Die Strukturdaten des 20S-Proteasoms der Hefe legen nahe, daß die Aminotermini der α -UE flexibel sind und Positionen einnehmen, die den Kanal (Durchmesser 1,2 nm) verschließen können (Abb. 2B). Diese Vorstellung würde das Phänomen der Latenz erklären (McGuire & DeMartino, 1989; Tanaka et al. 1989). Hierunter wird die äußerst niedrige Basalaktivität des aufgereinigten Proteasoms verstanden. Erst eine geringe Konzentration von SDS, Polylysin oder eine Erhöhung der Temperatur heben die Latenz auf. In dieser Eigenschaft entsprechen die genannten Effektoren den Proteasomaktivatoren PA28 und PA700.

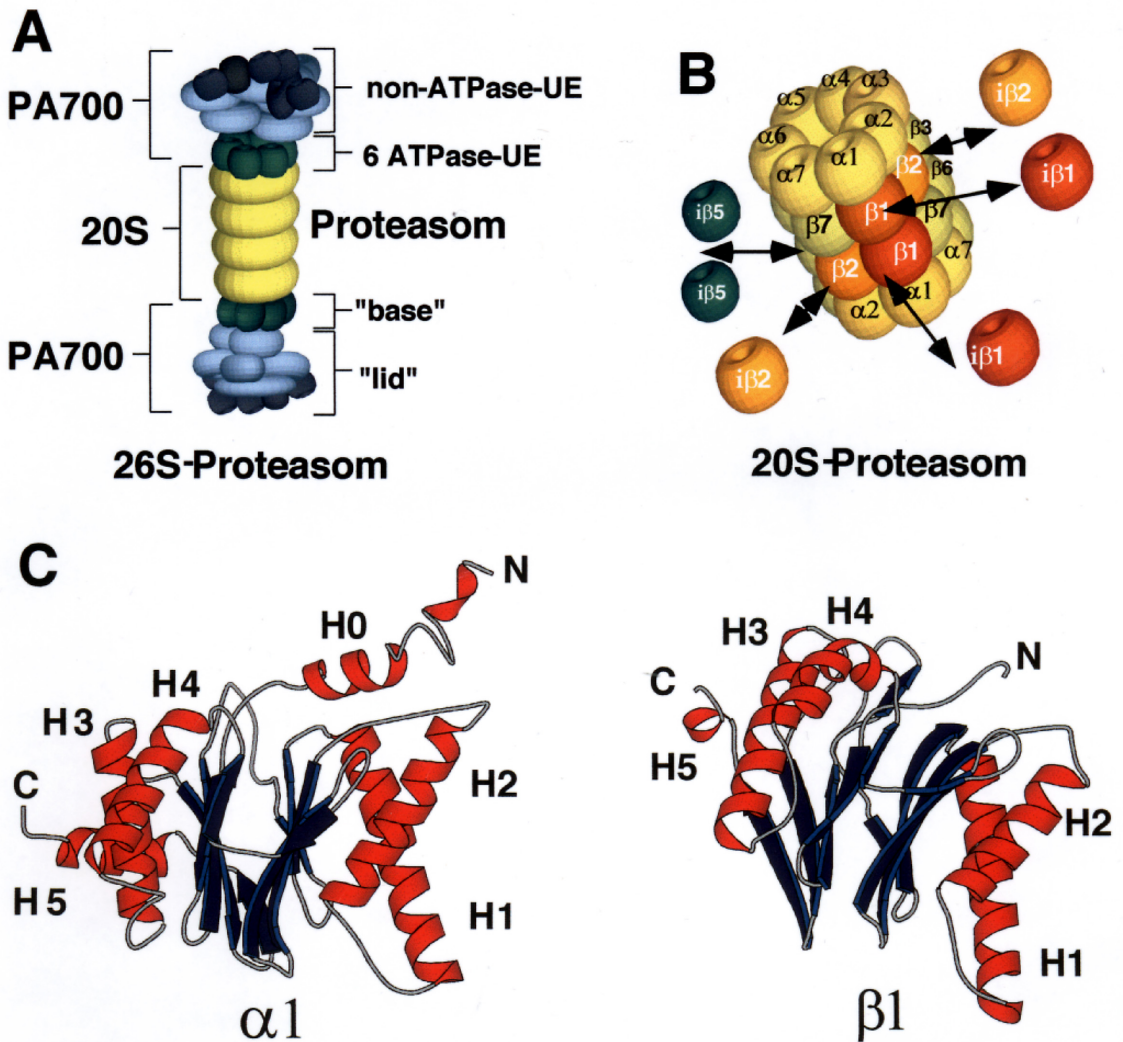


Abb. 2. Strukturmodelle des Proteasoms. (A) Schematische Darstellung des 26S-Proteasoms. (B) Modulation der Zusammensetzung des 20S-Proteasoms in Mammalia. Die Primärstrukturen aller Proteasom-UE der Maus sind inzwischen bekannt (Elenich et al. 1999). Proteasomen aus Mammalia und Hefe entsprechen sich in ihrer Untereinheiten-Topologie (Dahlmann et al. 1999). (C) Tertiärstruktur typischer alpha- und beta-UE des 20S-Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die N-terminalen Helices (H0) der α -UE ragen in die Öffnungen der proteasomalen α -Ringe. Eine entsprechende H0-Helix fehlt in den β -UE. Die "ribbon"-Darstellung wurde mittels RASMOL und MOLSCRIPT erstellt. Es wurde der Datensatz von Groll et al. 1997 (1ryp.pdb) verwendet. Die β -UE, die an IFN- γ -induzierten Austauschen beteiligt sind (B), etablieren die sechs aktiven Zentren des Proteasoms. Basierend auf Strukturdaten und Inhibitorstudien wird folgender Katalysemechanismus postuliert: Die Hydroxylgruppe des Thr-1 greift das Carbonyl-C-Atom der Peptidbindung nukleophil an. Voraussetzung hierfür ist die Erniedrigung des pKa-Wertes der Aminogruppe des N-terminalen Thr-1 durch das konservierte LYS-33. Dies ermöglicht die Protonenakzeptorfunktion der Aminogruppe (Bochtler et al. 1999).

In höheren Eukaryonten wurden neben dem konstitutiven Sortiment an α - und β -Untereinheiten weitere Proteasom-UE entdeckt, die nach Induktion mit Interferon- γ in das 20S-Proteasom eingebaut werden und konstitutive "active-site"-Untereinheiten ersetzen (Übersicht: Tanaka & Kasahara, 1998). Die Konsequenzen cytokin-induzierter Austausche von Proteasomuntereinheiten wurden von mir (in Kooperation mit M. Groettrup) in verschiedenen zellulären Systemen untersucht (siehe Kapitel 2: Ergebnisse A).

Das 26S-Proteasom ist ein supramakromolekularer Komplex aus 20S-Proteasom und zwei 19S-Komponenten. Die 19S-Komplexe (PA700) assoziieren ATP-abhängig mit der 20S-"core protease" (Abb. 2A, Schema nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen; Walz et al. 1998). Der Proteasomaktivator PA700 besteht - in Abhängigkeit vom Untersuchungsobjekt (Spezies/Gewebe/Zelltyp) - aus mindestens 17 Untereinheiten (Mammalia: 21-112 kDa; Hefe: 30-120 kDa). Der Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae* (Glickman et al., 1998a; 1998b) läßt sich biochemisch in den "Basiskomplex" (engl.: base) und den "Deckelkomplex" (engl.: lid) separieren. Der Basiskomplex besteht aus 6 ATPasen der AAA-Familie (Rpt1-Rpt6) und besitzt Chaperon-ähnliche Aktivitäten (Braun et al., 1999). Der Deckelkomplex enthält 9 nicht-ATPase-Untereinheiten (Rpn3, Rpn5-Rpn12). Zwei mit dem "base" assoziierte nicht-ATPase-Untereinheiten verbinden die beiden Subkomplexe zum PA700 Proteasomaktivator. Dieser Komplex vermittelt die Erkennung (Deveraux et al., 1995) und Entfaltung von Proteinsubstraten (Braun et al., 1999).

Die Zusammensetzung des PA700-Regulators aus höheren Eukaryonten unterliegt möglicherweise einer Modulation durch unbekannte zelluläre Faktoren. Aufreinigungen des 26S-Proteasoms aus verschiedenen Geweben/Zellen wiesen Unterschiede in der Zusammensetzung ihrer PA700-Komponente auf. Es konnte bisher nicht geklärt werden, ob es sich bei den Proteinen, die kein Äquivalent im Hefe-Komplex besitzen, um transient assoziierte Proteinfaktoren (z.B. Kinasen) handelt. Einige Untereinheiten des PA700-Komplexes aus Säugern, wie z.B. SUG1 oder TBP1, sind offensichtlich nicht nur Bestandteile des 26S-Proteasoms, sondern wurden auch in anderen Proteinkomplexen nachgewiesen (Russel, 1999). Untereinheiten des 26S-Proteasomes interagieren mit zahlreichen zellulären Proteinen. In den Fällen, in denen eine Proteasom-Substrat-Beziehung ausgeschlossen werden kann, muß davon ausgegangen werden, daß derartige Interaktionen der Modulation des Proteolyseapparates und der Kommunikation zwischen verschiedenen zellulären Basisfunktionen wie Proteolyse, DNA-Reparatur, Transkription und Translation dienen (Aravind & Ponting, 1998; Russel, 1999).

1.4. Proteasomale Proteolyse und MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation

Der proteasomale Proteinabbau ist eine Voraussetzung für die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation nicht-endolysosomal-exprimierter eigener und fremder Antigene. Darüberhinaus können in Makrophagen auch Substrate des klassischen MHC-Klasse-II-Weges vom Proteasom degradiert und über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden (Abb. 3; Rock & Goldberg, 1999). MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation und cytotoxische T-Zellantwort zur Erkennung und Zerstörung infizierter oder kancerogen entarteter Zellen basieren auf der cytosolisch/nukleären Prozessierung von

Proteinen zu kurzen Peptiden, die über die TAPs (engl.: "transporters associated with antigen presentation") ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert werden. Dort ermöglichen sie die Assemblierung von trimeren MHC-I-Peptid-Komplexen, die nach Transport zur Plasmamembran von cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL's) erkannt werden (Abb. 3). An der Optimierung der Peptidgenerierung hinsichtlich einer Verbesserung der Bindungseigenschaften an TAP-Transporter und MHC-Klasse-I-Moleküle (Rammensee et al., 1993) sind sowohl die Immunoproteasomen als auch der Proteasomaktivator PA28 beteiligt (Kloetzel, Soza & Stohwasser, 1999).

Die PA28-Proteinfamilie besteht in Mammalia aus drei Proteinen, die in Hefe keine Entsprechung haben. Die Untereinheiten PA28 α (27.7 kDa) und PA28 β (27.1 kDa) wurden als heterohexamere 11S-Komplex aus Blut und verschiedenen Geweben isoliert (Dubiel et al., 1992; Chu-Ping et al., 1992a) und als allosterische Aktivatoren der Peptidaseaktivitäten des 20S-Proteasoms beschrieben. In neueren Studien konnte gezeigt werden, daß eine Überexpression der PA28 α Untereinheit die Präsentation viraler, MHC-Klasse-I-restringierter Epitope verbessert. Außerdem konnte eine effizientere Prozessierung der entsprechenden Epitope nach Aktivierung des 20S-Proteasoms durch aufgereinigten PA28-Aktivator *in vitro* nachgewiesen werden (Dick et al., 1996). Funktionen des dritten Vertreters der PA28-Familie, des Autoantigens PA28 γ (auch Ki-Antigen genannt; 32 kDa), sind bisher nicht nachgewiesen. Die Mechanismen, über welche PA28 die Antigenpräsentation beeinflusst, sind nur unvollständig verstanden und wurden daher in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die kinetische Modellierung unserer experimentellen Daten deutet eine in-vitro-Funktion von PA28 als Translokationsenzym an, welches den Substrateintritt/Produktaustritt am 20S-Proteasom reguliert (Kapitel 3.1.3).

1.5. Mikroglia - eine immunologische Effektorzelle im ZNS

Im Gehirn können aufgrund morphologischer Kriterien drei verschiedene Mikroglia Typen nachgewiesen werden. Ramifizierte, ruhende Mikroglia ist der unter nicht-pathologischen Bedingungen vorherrschende Typ, aktivierte Mikroglia tritt hingegen unter pathologischen Bedingungen auf. Phagozytierende Mikroglia repräsentiert einen weiteren Aktivierungszustand.

Residente Mikrogliazellen der Maus lassen sich als Makrophagen-ähnliche Zellen mit erhöhter Expression der Oberflächenmoleküle Mac1, Mac3, F4/80, CD44, CD54, CD86 und CD45 klassifizieren, während andere Moleküle nur eine marginale (MHC-Klasse-I, CD14, CD40, CD80) oder keine detektierbare Expression (MHC-Klasse-II, CD4, CD8, CD45R, CD102) erkennen lassen (Havenith et al., 1998). Mit Hilfe dieser molekularen Phänotypisierung können Mikrogliazellen sowohl von diversen Zelltypen abgegrenzt als auch hinsichtlich ihres Aktivierungszustandes unterschieden werden. So erlaubt der Marker CD45 eine Unterscheidung von Makrophagen (CD45^{high}) und Mikroglia (CD45^{low}) und ermöglicht die Zellsorter-gestützte Trennung beider Zelltypen (Ford et al., 1995).

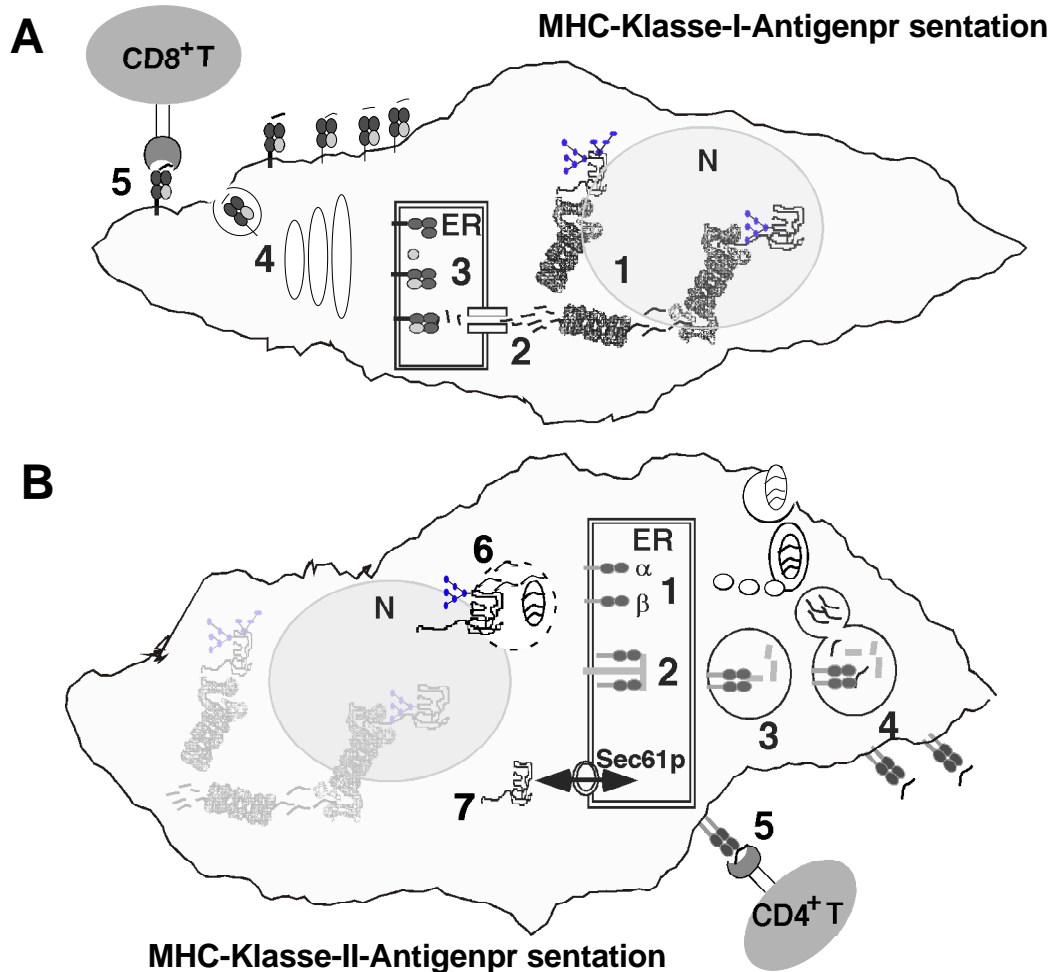


Abb. 3. Modellvorstellungen zur Antigenpräsentation: A . MHC Klasse I: (1) Degradation endogen exprimierter Proteine durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg. (2) Transport von Peptiden (7-15mere) durch den TAP-Transporter ("transporter associated with antigen presentation" - TAP). (3) Assemblierung und Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen. Das Chaperon Calnexin vermittelt die Assemblierung von β 2-Microglobulin und der α -Kette. Heterodimere MHC-I-Moleküle assoziieren über Tapasin mit den TAP's und werden mit Peptiden (8-10mere) beladen und stabilisiert. (4) Exocytotische Route zur Plasmamembran. (5) Erkennung des trimeren MHC-Peptidkomplexes durch spezifische T-Lymphozyten. "Crosstalk" mit MHC-Klasse-II: Einige endogene Proteine können über spezifische Signalsequenzen dem Endozytoseweg zugeführt und im Kontext von MHC-Klasse-II Molekülen präsentiert werden (Reiman & Kaufmann, 1997).

B . MHC-Klasse-II: (1) Calnexin vermittelt die Assemblierung der α - und β -Ketten.. (2) Assoziation mit der i-Kette ("invariant chain") verhindert die vorzeitige Beladung mit Pepiden im ER. (3) Prozessierung der "invariant chain" und Blockierung der Peptidbindungstasche mit dem CLIP Peptid. (4) Verdrängung des CLIP-Peptides durch Peptide, die im endozytischen Weg durch endolysosomale Degradation exogener Proteine durch Kathepsin B und D entstehen. (5) Erkennung von Peptid-Epitopen im Kontext von MHC-Klasse -II-Molekülen durch spezifische T-Lymphozyten. "Crosstalk" mit MHC-Klasse-I: (6) "Escape" von Bakterien aus endolysosomalem Kompartiment oder Sekretion bakterieller Antigene (Zwickey & Potter, 1999). (7) Rolle des Sec61p-Proteinkanals beim retrograden Transport. Sekretorische oder integrale Membranproteine können auf diesem Weg Zugang zur cytosolischen Degradationsmaschinerie erhalten und im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (Biederer et al. 1996; 1997) .

Die Aktivierung von Mikroglia führt in verschiedenen Modellen zu einer erhöhten Expression von MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen und wird als Indiz für die Immunkompetenz der Mikroglia betrachtet (Frei et al., 1987, Streit et al., 1989, Morioka et al., 1992, Cash & Rott, 1994, Wekerle et al., 1994).

Der Mikroglia kommt innerhalb des HIV-Dementia-Komplexes (HIVD) eine Schlüsselfunktion zu, da Mikroglia/Makrophagen das Hauptreservoir für virale Proliferation im ZNS darstellen und somit auch zur Evolution neuer viraler Subspezies beitragen (Kolson et al., 1998). Murine Oncornaviren können ebenfalls Mikrogliazellen infizieren und werden als Modell spongiphormer Encephalopathien betrachtet (Portis & Lynch, 1998). Kürzlich konnte in einer Fallstudie von Hämorrhagischem Fieber Dengue-Viren (Flaviviridae) nicht nur in hämatopoetischen Zellen und Neuronen des cerebralen Cortex, sondern auch in Astrozyten und in Mikroglia nachgewiesen werden (Ramos et al., 1998).

Als Voraussetzung für ein tieferes Verständnis viraler Persistenzmechanismen in Mikroglia ist die Etablierung eines MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsmodell in Mikroglia erforderlich. Daher wurde das 20S-Proteasom und assoziierte Regulatoren als Teil der Antigenprozessierungsmaschinerie der Mikroglia untersucht.

1.6. Fragestellungen und Methodik

Die Identifizierung der Proteasomgene LMP2 und LMP7 in der genomischen Region des MHC-Klasse-II-Locus (Glynne et al., 1991; Kelley et al., 1991; Martinez et al., 1991; Ortiz et al., 1991; Robertson et al., 1991), sowie deren Induzierbarkeit durch IFN- γ löste Diskussionen zur Rolle des Proteasoms in der Antigenpräsentation aus. Der Nachweis einer durch IFN- γ koordinierten Expression von LMPs und TAPs und die Entdeckung des ebenfalls durch IFN- γ induzierten Proteasomaktivators PA28, sowie der Nachweis einer verbesserten Präsentation MHC-Klasse-I-restringierter Epitope in PA28 α -transfizierten B8 Zellen, belegten eindeutig die Bedeutung des Proteasoms für die Antigenprozessierung. Dennoch präsentiert sich ein unvollständiges Bild bezüglich des genauen Mechanismus und der Bedeutung einzelner Komponenten des Proteasomsystems innerhalb der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation. Die von mir durchgeführten Untersuchungen und die im folgenden zusammengefaßten Publikationen (Eigenzitate: Nummern in eckiger Klammer) stellen einen Beitrag dar, diese Erkenntnislücken zu schließen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Identifizierung von Proteasomuntereinheiten der Maus [1], die Entdeckung und Klonierung zweier neuer β -Untereinheiten [2], sowie der Einfluß von Interferon- γ auf die Zusammensetzung und Funktion des Proteasoms [3, 4], geschildert. Außerdem werden die immunologischen Studien an LMP7-„knock out“-Mäusen (Fehling et al., 1994) durch die von mir durchgeführte biochemische Charakterisierung des 20S-Proteasoms aus verschiedenen Geweben aus LMP7-defizienten Mäusen ergänzt [5]. Die Beschreibung der gewebespezifischen Expression von sogenannten konstitutiven Proteasomen in nicht-lymphatischen Geweben und das reziproke Vorkommen von Immunoproteasomen in lymphatischen Geweben [2] warf die Frage auf, welcher

Proteasomtyp in der immunologisch relevanten Makrophagenart des Gehirns, der Mikroglia, in verschiedenen Aktivitätszuständen vertreten sein würde. Es wurde von uns erstmals gezeigt, daß primäre Mikrogliazellen, die aus dem Cortex neonataler Mäuse isoliert wurden, nach Aktivierung sowohl durch IFN- γ als auch nach Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) nicht nur Immunoproteasomen exprimieren, sondern auch Veränderungen der Zusammensetzung des PA700 Regulators aufweisen. Diese Befunde sind im Hinblick auf die Funktionen der Mikroglia als immunologischer Effektorzelle von erheblicher Bedeutung [6].

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit hat die funktionelle Charakterisierung der Proteine der PA28-Familie zum Gegenstand [7]. Die Konsequenzen und der Mechanismus der Proteasomaktivierung wurden auf drei verschiedenen Ebenen analysiert:

◆ 1. durch Analyse der Auswirkungen einer Überexpression der drei Mitglieder der PA28-Genfamilie. Im Vordergrund stand hierbei die Frage, warum überexprimiertes PA28 β ebenso wie PA28 α oder PA28 $\alpha\beta$ die Effizienz der Präsentation eines MHC-Klasse-I-Epitops erhöht.

Die Funktionen überexprimierter PA28-Proteine wurden in transfizierten Zelllinien untersucht, die als ein weiteres Transgen das pp89-Protein des Mauscytomegalovirus stabil exprimieren. Die PA28 α -/PA28 β - und PA28 $\alpha\beta$ -Transfektanten wurden von A.Soza und M.Groettrup zur Verfügung gestellt. Die PA28 γ -Transfektante wurde von mir etabliert.

◆ 2. durch Protein-Protein-Interaktionsstudien im "yeast two-hybrid"-System, GST-"pull down"-Experimente und die FarWestern-Technologie: Zu klären war die Frage, welche der sieben α -Proteasomuntereinheiten die Aktivierung durch PA28 $\alpha/\beta/\gamma$ vermittelt. Außerdem wurden Mutagenesestudien durchgeführt, um Hinweise auf Funktionen spezifischer Domänen der PA28-Proteine zu erhalten.

◆ 3. durch Etablierung eines in vitro-Rekonstitutionssystems für aktivierte 20S-Proteasom-PA28-Komplexe. Durch Verwendung geeigneter kinetischer Modelle sollten Hinweise auf den Mechanismus der PA28-vermittelten Aktivierung des 20S-Proteasoms untersucht werden. Solche Modelle lassen in begrenztem Umfang mechanistische Rückschlüsse zur Arbeitsweise des Proteasoms und seiner Aktivatoren zu.

Die im Kapitel 3 - Ergebnisse B- abgehandelten Fragestellungen wurden ausführlich dargestellt, da die zugehörigen Manuskripte sich noch im Begutachtungsprozess befinden oder abschließende Experimente zur Abrundung einer Veröffentlichung noch erforderlich sind.

2.1. Zusammensetzung und Funktion des 20S-Proteasoms der Maus

20S-Proteasomen aus verschiedenen Eukaryonten (*Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*) wurden in den letzten 17 Jahren biochemisch und molekularbiologisch charakterisiert (Kleinschmidt et al., 1983; Schmid et al., 1984; Dahlmann et al., 1985; McGuire & DeMartino, 1986; Kloetzel, 1987; Tanaka et al. 1986, 1988; Heinemeyer et al. 1991). Mit der Ausrichtung der Proteasomforschung auf immunologische Fragestellungen (Robertson, 1991; Glynne et al. 1991) gewann das Maus-Modellsystem zu Beginn der Neunzigerjahre zunehmend an Bedeutung (Brown et al. 1991, 1993; Van Kaer et al. 1994; Fehling et al. 1994).

Es konnte gezeigt werden, daß Interferon- γ die Peptidaseaktivitäten des Proteasoms für Schnitte hinter hydrophoben und basischen P1-Aminosäureresten erhöht, während die saure Schnittpräferenz in ihrer Aktivität abnimmt (Gazycska et al., 1993; Driscoll et al., 1993). Als Ursache der modifizierten Substratspezifitäten wurde eine veränderte Zusammensetzung des Proteasoms nach Cytokinbehandlung angenommen, wobei neben dem verstärkten Einbau der Untereinheiten LMP2 und LMP7 die Zunahme eines dritten Proteins bemerkt wurde (Brown et al., 1993; Boes et al., 1994). Es konnte zwar ein Zusammenhang zwischen veränderten Peptidaseaktivitäten und dem Einbau der LMP-Genprodukte ins Proteasom hergestellt werden (Driscoll et al., 1993; Frentzel et al., 1993; Früh et al., 1994; Gaczynska et al., 1994), jedoch wurden von verschiedenen Gruppen unterschiedliche Korrelationen bezüglich einzelner Peptidaseaktivitäten gefunden (Kuckelkorn et al., 1995; Ustrell et al., 1995, [5] Stohwasser et al., 1996). In Fortführung der Studien von Boes (1994) wurde daher die Dynamik der Zusammensetzung des Proteasoms in RMA-Lymphoblastomazellen, B8-Fibroblasten, Mikrogliazellen und in verschiedenen Geweben der Maus von mir untersucht.

2.1.1. Identifizierung der Untereinheiten des Proteasoms der Maus [1; 2]:

IFN-g-induziert den Austausch von drei Proteasomuntereinheiten

Der methodische Ansatz bestand in der biochemischen Aufreinigung von 20S-Proteasomen aus B8 Fibroblasten, die in Gegenwart von Interferon- γ kultiviert wurden. Die Auftrennung der individuellen Proteasomeinheiten erfolgte in zweidimensionalen (2D) Gelelektrophoresen. Nach Separierung der Untereinheiten in der 1. Dimension mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) oder durch "non-equilibrium-pH-gradient electrophoresis" (NEPHGE) erfolgte die Trennung in der 2. Dimension über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). In Coomassie-gefärbten 2D-Gelen konnten 17 Untereinheiten definierte Positionen zugeordnet werden. Die Proteine wurden aus den Gelstücken eluiert, trypsiniert und einer Sequenzanalyse unterzogen. Mittels dieses Ansatzes wurde von mir zunächst die N3-UE des 20S-Proteasoms aus RMA-Zellen identifiziert (Peptidsequenzierung: G. Mulhaupt, Heidelberg). Später folgte in Kooperation mit R. Kraft und M. Groettrup die Identifizierung der fehlenden 20S-Proteine [1].

Die resultierenden Peptidsequenzen ermöglichten auf der Grundlage bestehender Homologien zu Proteasomuntereinheiten anderer Spezies eine Identifizierung aller Untereinheiten der Maus. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit unserer Gelsysteme konnten auch Proteasomuntereinheiten aus Immunpräzipitaten auf Autoradiogrammen von 2D-Gelen über einen Positionsvergleich mit unseren sequenzierten Referenzspots identifiziert werden. Diese Technik wurde insbesondere bei der Charakterisierung des Proteasoms aus Mikroglia der Maus eingesetzt [6].

In B8-Fibroblasten konnten wir 14 konstitutive Maushomologe von Hefeuntereinheiten identifizieren. Nach Behandlung der Zellen mit IFN- γ wurden zusätzlich drei weitere β -Untereinheiten nachgewiesen [1]. Der Einbau dieser Untereinheiten führte zu einem reduzierten Einbau von drei konstitutiven Untereinheiten. Während zwei der genannten Substitutionen die schon erwähnten LMP-Genprodukte des MHC-Klasse-II-Locus betreffen (β 1/DELTA/Y, i β 1/LMP2) und (β 5/MB1/X, i β 5/LMP7) (Früh et al., 1994; Akiyama et al., 1994a; 1994b), handelte es sich bei dem dritten Austauschpaar um zwei neue Proteasomuntereinheiten. Die 28 N-terminalen Aminosäurereste, sowie 87 Reste aus tryptischen Peptidverdaus der neuen induzierbaren Untereinheit wiesen eine signifikante Homologie (87%) zum i β 2/MECL-1- Genprodukt auf, welches auf dem humanen Chromosom 16q22.1 - also außerhalb der MHC-Klasse-II-Region - kodiert ist (Larsen et al., 1993). Ein entsprechender Austausch (X gegen LMP7; Y gegen LMP2; Z gegen MECL-1) wurde zur gleichen Zeit auch für das Proteasom humanen Ursprungs beschrieben (Hisamatsu et al., 1996). Die Peptidsequenzen der neuen konstitutiven Untereinheit β 2/MC14 wiesen 58% Identität zur deduzierten Sequenz des humanen i β 2/MECL-1-Proteins auf.

Die an B8-Fibroblasten gewonnene Erkenntnisse über die Zusammensetzung des 20S- Proteasoms wurden in einem weiteren zellulären System, der T-lymphoblastoiden RMA-Zelllinie, verifiziert [2]. Außerdem wurde die Induzierbarkeit der Immunoproteasomuntereinheiten in Abhängigkeit von der Interferon- γ -Dosis über einen Induktionszeitraum von 48h untersucht, da Unklarheit über die Korrelation zwischen Cytokindosis und Austauschrate bestand. Meine Studien zeigten, daß die Behandlung von RMA-Zellen mit kleineren IFN- γ -Konzentrationen (5U/ml) ausreichend sind, um einen Austausch aller drei "active-site"-Untereinheiten zu beobachten. Im Gegensatz zu B8-Proteasomen verfügen RMA-Proteasomen auch in Abwesenheit von IFN- γ über einen hohen Anteil an i β 1/LMP2 und i β 5/LMP7 und über nachweisbare Mengen an i β 2/MECL-1. Eine Dosis von 0.5 U/ml IFN- γ war unzureichend, um den Level an Immunoproteasom-untereinheiten signifikant zu erhöhen. Erst eine Dosis von 5 bzw. 50 U/ml erhöhte den Anteil der induzierbaren Untereinheiten deutlich. Die Austauscheffizienzen für die drei Immunoproteasomuntereinheiten waren unterschiedlich. Bei einer Cytokindosis von 500 U/ml wurde β 1/Delta nahezu vollständig von i β 1/LMP2 ersetzt, während β 2/MC14 nur unvollständig gegen i β 2/MECL-1 ausgetauscht wurde. Eine densitometrische Abschätzung ergab, daß β 2/MC14 und i β 2/MECL-1 in den 20S-Immunpräzipitaten in einem Verhältnis von ca. 1:1 vorlag [2]. Da das 20S-Proteasom eine Halbwertszeit von 12-15 Tagen besitzt (Tanaka & Ichihara 1989a; 1989b) ist davon auszugehen, daß nach IFN- γ -Induktion neben neu

assemblierten Immunoproteasomen die konstitutive Subpopulation weiterbesteht. Da beide Populationen unterschiedliche Schnittpräferenzen besitzen, wird das generierte Peptidspektrum zur MHC-KlasseI-restringierten Oberflächenexposition erheblich erweitert.

Andere Cytokine wie z.B. IL-2 bewirkten keinen Einbau von Immunoproteasom-UE in das 20S-Proteasom, beeinflussten jedoch die in 2D-Gelen nachweisbare Menge und Gelposition der Proteasom-UE $\alpha 7/C8$ [2]. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf Phosphorylierung der $\alpha 7/C8$ -UE zurückzuführen (Castano et al. 1996). Das von $CD4^+$ -T-Helferzellen sekretierte immunregulatorische Cytokin IL-2 wirkt über den Januskinase-Weg (JAK-1/3; STAT-3/5) und GRB2/SOS-Adaptorkomplexe auf verschiedene Proteinkinasekaskaden (Raf/Ras; MAPK) (Waldman et al., 1998).

2.1.2. Charakterisierung der MC14 und MECL-1-spezifischen cDNAs

Unvollständige MC14-cDNAs sowie vollständige MECL-1-cDNAs wurden aus einer Milz-cDNA-Bank der Maus (Lambda-ZAP II) nach Hybridisierung mit humanen cDNA-Proben unter niedrigen Stringenzbedingungen isoliert und sequenziert. Die fehlenden 3'-und 5'-Termini der MC14-cDNA wurden über einen RACE-Ansatz kloniert [3]. Ein Zugriff auf die Sequenzen, die in der Genbank/EMBL gespeichert sind, ist unter den Nummern Y10874 ($\beta 2/MC14$) und Y10875 ($i\beta 2/MECL-1$) möglich.

Die MC14-cDNA weist 59.9% Identität zur MECL-1-cDNA der Maus und 56.8 bzw. 57.7 % Identität zu den Hefehomologen aus *Saccharomyces cerevisiae* bzw. *Schizosaccharomyces pombe* auf. Die Aminosäureidentitäten $\beta 2/MC14$ versus $i\beta 2/MECL-1/ScPUP1/SpC14$ betragen 56.8, 55.4 und 60.5 %. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aus Maus und Mensch ergibt eine Identität von 96% für MC14/Z und von 88% für mMECL-1/hMECL-1 [3].

Unsere Erkenntnisse bezüglich der Primärstruktur des neuen MC14/MECL-1-Austauschpaares wurde ergänzt durch die zeitgleiche Publikation der genomischen Klone Psmb10 (MECL-1) und Psmb7 (MC14), die auf den Chromosomen 2 und 8 der Maus lokalisiert sind (Hayashi et al., 1997). Der Promotor des MECL-1 Genes enthält zwei IFN- γ -stimulierbare cis-regulatorische Transkriptionselemente (IRE's; "IFN- γ responsive elements").

2.1.3. Reziproke Expression von Proteasom-b-UE in Geweben der Maus

Die detaillierte Untersuchung der gewebespezifischen Expression der konstitutiven $\beta 2/MC14$ und der IFN- γ -induzierbaren $i\beta 2/MECL-1$ -UE ergab eine reziproke Expression in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben. In Thymus, Lymphknoten und Milz werden MECL-1-, wie auch LMP2- und LMP7-mRNA's verstärkt exprimiert, während die homologen konstitutiven Z/MC14-, Y/Delta-, und X/MB1-mRNA's in nur geringen Mengen in Northern-Hybridisierungen nachweisbar sind. In nicht-lymphatischen Geweben sind hingegen alle drei mRNAs der konstitutiven Homologe der IFN- γ -induzierbaren Untereinheiten stark exprimiert [3]. Proteinbiochemische Untersuchungen belegen eine Korrelation der vorgefundenen mRNA -Niveaus mit der Menge der ins 20S-Proteasom eingebauten

Untereinheiten [3]. So werden in nicht-lymphatischen Geweben der Maus überwiegend konstitutive Proteasomen gefunden, während die Immunoproteasomen in lymphatischen Geweben überwiegen [3]. Die Substitutionspartner der LMP2- und LMP7-Proteine wurden durch Studien an "knock out"-Mäusen und in Transfektanten eindeutig identifiziert (Van Kaer, 1994; Fehling et al., 1994; Früh et al., 1994; Kuckelkorn et al., 1995; [5]). Nach Einbau von MECL-1 wurde neben der Abnahme von Delta und MB1 ausschließlich die Verminderung des MC14-Proteinspots beobachtet. Daher ist der Austausch dieser beiden Untereinheiten damit eindeutig nachgewiesen [3].

Das gemeinsame Auftreten der konstitutiven "active site"-Untereinheiten ($\beta 2/Z/MC14$; $\beta 1/Y/Delta$; $\beta 5/X/MB1$) und der IFN- γ -induzierbaren "active site"-Untereinheiten ($i\beta 2/Z/MECL-1$; $i\beta 1/Y/LMP2$; $i\beta 5/X/LMP7$) in Proteasompräparationen läßt sich entweder durch das Vorliegen zweier definierter Subpopulationen, oder durch den nur 50%-igen Einbau der Immununtereinheiten in jeweils eine und den Einbau der konstitutiven Untereinheiten in die andere Hälfte des 20S-Proteasoms, interpretieren. Da in RMA-Zellen eine Proteasom-Population beobachtet wurde, die einen vollständigen Austausch der Delta-UE, jedoch nur einen 50% Austausch der MC14-UE aufwies [2], ist anzunehmen, daß in dieser 20S-Population die konstitutive MC14-UE und die induzierbare MECL-1-UE sich in gegenüberliegenden β -Ringen befinden in einem Komplex befinden. Da bei niedrigen IFN- γ -Konzentrationen oder kurzen Induktionszeiten der LMP2/Delta-Austausch ebenfalls unvollständig ist, muß die Anzahl proteasomaler Subpopulationen, und damit möglicherweise die Vielfalt von Peptidprodukten in der Zelle, noch größer sein. Die Existenz proteasomaler Subpopulationen wurde schon von Brown (1991) postuliert und von Nandi et al. (1997) durch Immunpräzipitationen bestätigt. Die Vielfalt proteasomaler Komplexe wird möglicherweise auch durch allelische Isoformen von α -Untereinheiten erhöht. So wurde von Ni et al. (1995) eine zweite, um sechs Aminosäuren verkürzte, $\alpha 4/C6$ -UE entdeckt. In Geweben der Ratte werden beide UE gemeinsam exprimiert (Ni et al., 1995). Phosphorylierung von Proteasomuntereinheiten (Pereira & Wilk, 1990; Castano et al., 1996; Pardo et al., 1998; Rivett, 1998; Mason et al., 1998) dürfte ebenfalls zur Vielfalt proteasomaler Komplexe beitragen. Subtypen des Proteasoms aus Leber der Maus konnten mittels differentieller Salzelution ionenchromatographisch getrennt werden. Die 20S-Proteasomen variierten in ihrer Zusammensetzung wie auch in katalytischen Eigenschaften (Seelig et al., 1993).

Interessanterweise unterliegen die LMP2 und LMP7 Gene, die in enger Nachbarschaft zu den TAP-Genen im MHC-Klasse-II-Locus zu finden sind, einer koordinierten Expression mit den TAPs (Wright et al., 1995). Wie wir zeigen konnten, ist für die Regulation des koordinierten Einbaus des MECL-1-Genproduktes in das 20S Immunoproteasom keine räumliche Assoziation des MECL-1-Gens mit dem MHC-II-Locus erforderlich (Larsen et al., 1993; Hayashi et al., 1997), da der koordinierte Einbau über die Assemblierung des Proteasoms gesteuert wird. So konnten wir in Kotransfektionsexperimenten zeigen, daß der Einbau des MECL-1-Proteins direkt von der Gegenwart des LMP2-Proteins, nicht jedoch vom Vorhandensein des LMP7-Proteins abhängig ist [4]). Umgekehrt wird auch der Einbau von LMP2 durch MECL-1 gefördert. Diese Ergebnisse erklären möglicherweise die unterschiedlichen

Auswirkungen, die eine LMP-Deletion in LMP2- oder in LMP7-"knock out"-Mäusen für die Präsentation von MHC-Klasse-I-Antigenen haben, da bei einem LMP2-"knock out" gleichzeitig der Einbau von MECL-1 betroffen ist. Dieser faktische Doppelknockout beeinflusst daher vier aktive Zentren des Proteasoms, während bei der LMP7 Deletion nur die beiden LMP7-assoziierten aktiven Zentren betroffen sind.

Inzwischen ist die wechselseitige Beeinflussung des Einbaus von LMP2 und MECL-1 auch auf struktureller Ebene verständlich. Die homologen Untereinheiten des Hefeproteasoms liegen in direkter räumlicher Nachbarschaft (Groll et al., 1997), so daß eine direkte konformationelle Abhängigkeit beider Proteine voneinander plausibel erscheint. Außerdem wurde inzwischen gezeigt, daß die homologen Untereinheiten des Mammalia-Proteasoms identische Positionen im 20S Proteinkomplex einnehmen (Dahlmann et al., 1999).

2.1.4. Konsequenzen einer LMP7-Deletion in Knockout-Mäusen:

Zusammensetzung und Peptidaseaktivitäten des 20S-Proteasoms [5]

Durch Mutagenese der aminoterminalen Threoninreste des 20S-Proteasoms der Hefe konnte den drei UE Pre2, Pre3 und Pup1 jeweils eine spezifische Peptidaseaktivität zugeordnet werden (Heinemeyer et al., 1997). Mutationen des PRE3-Gens, eines Homologs der Mammalia-UE $\beta 1/\Delta$ und $i\beta 1/LMP2$, beeinträchtigt die PGPH-Aktivität des 20S-Proteasoms. Die Ausschaltung des PRE2-Gens, eines Homologs der Untereinheiten $\beta 5/MB1$ und $i\beta 5/LMP7$, reduziert die CHTR-Aktivität. Das PUP1-Gen, welches in phylogenetischer Verwandtschaft zu den Mammalia-UE $\beta 2/MC14$ und $i\beta 2/MECL1$ steht, vermittelt die TRYP-Aktivität. Im Gegensatz zu der inaktiven UE Pre4 besitzen die aktiven UE nicht nur einen N-terminalen Threoninrest in analoger Position zum Thr- $\beta 1$ des Proteasoms aus *Thermoplasma*, sondern auch ein Lysin in Position 33, welches am katalytischen Mechanismus beteiligt ist.

Die katalytischen Konsequenzen der LMP7-Deletion ($LMP7^{-/-}$) wurden von mir in LMP7-"knock out"-Mäusen untersucht [5]. Die LMP7-"knock out"-Maus wurde von Fehling (1994) etabliert. In $LMP7^{-/-}$ -Mäusen war die Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Moleküle H-2K , H2D und I-A auf 50% des Wildtypniveaus reduziert. Außerdem waren die $LMP7^{-/-}$ - Mäuse durch eine reduzierte Präsentation eines MHC-Klasse-I-restringierten Autoantigens charakterisiert. Im Gegensatz hierzu wurden keine Auswirkungen der LMP7-Deletion bezüglich des Gesundheitsstatus oder der Anzahl von T- und B-Lymphozyten registriert (Fehling et al., 1994). Als Ursachen wurden von den Autoren verschiedene LMP7-Funktionen diskutiert. So könnten LMP-Proteine die Assoziation des Proteasoms mit dem ER, z.B über eine Assoziation mit den TAP-Proteinen bewirken. Auch eine direkte Veränderung der katalytischen Zentren des Proteasoms wurde nicht ausgeschlossen. Eine weitere Möglichkeit, nämlich die Veränderung der Assoziationskonstanten des Immunoproteasoms für Regulatoren wie PA28, wurde von mir in Betracht gezogen und analysiert (Abschnitt 3.1.4).

Um zu prüfen, ob die LMP7-Deletion die katalytischen Eigenschaften des 20S-Proteasoms verändert, wurden 20S-Proteasomen aus verschiedenen Geweben von LMP7^{-/-}- und LMP7^{+/+}-Mäusen aufgereinigt und hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, ihrer Peptidaseaktivitäten und der Hydrolyse eines längeren Peptidsubstrates verglichen [5]. Ich konnte zeigen, daß als Konsequenz der Deletion des LMP7-Gens das konstitutive Homolog des β 5/LMP7-Proteins, nämlich die Untereinheit β 5/MB1, vermehrt in 20S-Proteasomen von Thymus und Milz eingebaut wird. In Leber und Milz wurde ein wesentlich geringerer β 5/MB1-Einbau ins Proteasom nachgewiesen als im Thymus. Die chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 20S-Proteasoms aus LMP7-Knockout-Mäusen war gegenüber der Wildtypkontrolle deutlich erhöht (+ 277% Vmax im Thymus, + 260 % Vmax in Milz und + 96% Vmax in Leber). Aktivitätszuwächse von 330% Vmax wurden auch in einer Studie mit 20S-Proteasom aus T2- Transfektanten in LMP7-''knock out''-Konstellation gemessen (Kuckelkorn et al., 1995). Humanen T2-Zellen fehlt die genomische Region des MHC-Klasse-II-Locus, der die TAPs und die LMPs kodiert. Daher entspricht eine LMP2/7 T2-Doppeltransfektante formal -bezüglich der Expression proteasomaler Untereinheiten- dem IFN- γ -induzierten Wildtyp mit verminderter MECL-1-Expression, während eine LMP2-T2-Transfektante der Konstellation aus der LMP7-''knock out''-Maus entspricht. Die Untersuchungen von Proteasomen aus T2-Transfektanten und LMP7-''knock out''-Mäusen deuten an, daß der verstärkte Einbau von β 1/MB1 bei vermindertem β 1-LMP7-Einbau und gleichzeitiger Präsenz von LMP2 die chymotrypsinähnliche Aktivität erhöht. Wie Aktivitätsmessungen am 20S-Proteasom aus Thymus zeigten, wurden die beiden anderen getesteten Peptidaseaktivitäten (TRYP und PGPH) von der Deletion des LMP7-Gens nicht beeinflusst [5].

2.1.5. Strukturelle Plastizität des 20S-Proteasoms in Mikroglia der Maus [6].

Im ZNS adulter Mäuse ist die Mikroglia eine Population relativ unreifer Antigen-präsentierender Zellen (engl.: APCs), die trotz Expression kostimulatorischer Moleküle (B7.2, ICAM-1, CD40) zwar T-Zellproliferation stimulieren, jedoch keine Antigene präsentieren kann (Carson et al., 1998). Die Aktivierung von Mikroglia führt zur Expression von MHC-Klasse-I und -II-Molekülen. Während die Rolle der Mikroglia als APC des MHC-Klasse-II-Weges und bei der Aktivierung von TH1-Lymphozyten belegt ist (Aloisi et al., 1998), sind die Mechanismen der MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung und -Präsentation in Mikroglia bisher auf molekularer Ebene nicht im Detail untersucht worden.

2.1.5.1. Nachweis von Immunoproteasomen in aktiverter Mikroglia

Wir verwendeten primäre kultivierte Mikrogliazellen um die Korrelation zwischen Parametern der Aktivierung und der strukturellen Plastizität des 20S-Proteasoms, wie auch des 26S-Proteasoms zu untersuchen. Lipopolysaccharid- oder Interferon- γ -stimulierte Mikroglia weist charakteristische Eigenschaften aktivierter Mikroglia auf [6]. So setzen aktivierte Mikrogliazellen die Cytokine TNF α und IL-6 sowie das Chemokin KC (Gro α) frei [6] und verändern ihre elektrophysiologischen

Eigenschaften (Draheim et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, daß Mikrogliazellen "inward-rectifying"-K⁺ Kanäle (IR-Kanäle) exprimieren, während peritoneale Makrophagen durch auswärts gerichtete K⁺-Ströme (OR-Kanäle) charakterisiert sind (Boccini et al., 1992 ; Kettenmann et al., 1993). Eine Aktivierung kultivierter Mikrogliazellen führte zu einer Veränderung der K⁺-Kanalprofile, d.h. in stimulierter Mikroglia lassen sich K⁺-Auswärtsströme ableiten, wie sie sonst nur für Makrophagen und dentritische Zellen typisch sind (Fischer & Eder 1995). Die elektrophysiologischen Eigenschaften und das Spektrum sekretierter Cytokine und Chemokine wurden von uns herangezogen, um den Aktivierungszustand unseres Systems zu definieren.

Eine Stimulierung von Mikroglia wie auch von BV-2 Zellen mit IFN- γ führte zur Expression des Immunoproteasoms. Überraschenderweise fanden wir ähnliche Veränderungen nach Induktion mit Lipopolysaccharid (LPS) nur in primären Mikrogliazellen. Diese Ergebnisse belegen, daß aktivierte Mikroglia ihre proteasomale Untereinheitenzusammensetzung den Erfordernissen einer optimierten MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation anpassen kann [6]. Die Tatsache, daß LPS als bakterieller Induktor der Aktivierung ebenfalls ein Modulator der 20S- Zusammensetzung ist, wird im Kontext eines "crosstalks" zwischen MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Systemen interpretiert (siehe auch Übersicht: Abb. 3; Kovacsovics-Bankowski & Rock, 1994; 1995). Möglicherweise erfordert die Prozessierung einiger bakterieller MHC-Klasse-I- Epitope eine Modulation des proteasomalen Systems über bakterielle Stimuli, die nach klassischer Sicht eher im Zusammenhang mit der MHC-Klasse-II-Antigenpräsentation betrachtet werden. Eine Modulation des proteasomalen Systems durch LPS wurde bisher in anderen zellulären Systemen noch nicht beschrieben und in Makrophagen, also den Zellen, die am ehesten der Mikroglia entsprechen, nicht untersucht. So bleibt zu klären, ob es sich bei den LPS-induzierten Austausch von Proteasomuntereinheiten um eine Besonderheit der Mikroglia handelt. Die BV-2 Zelllinie, die als Modellsystem für aktivierte Mikroglia betrachtet wurde, reagiert zwar nach IFN- γ - nicht jedoch nach LPS-Behandlung mit den typischen Substitutionen von Untereinheiten des proteasomalen Systems. Nach Stimulation mit IFN- γ oder LPS unterscheiden sich BV-2-Zellen auch hinsichtlich ihre Profile freigesetzter Cytokine und Chemokine von primären Mikrogliazellen [6].

2.1.5.2. Die strukturelle Plastizität von PA700 in Mikroglia

Der PA700-Komplex wurde als Proteasomaktivator beschrieben, scheint jedoch auch Funktionen außerhalb der Proteolyse auszuführen (Russel et al., 1999). Eine Aufreinigung von PA700 in Assoziation an das 20S-Proteasom gelang in Form des 26S-Proteasoms aus Geweben verschiedene Spezies (Peters et al. 1991; 1993; Ugai et al. 1993; Fischer et al., 1994; Chu-Ping et al., 1994; Dubiel et al. 1995; Akashi et al. 1996a; 1996b). Unterschiede in der Zusammensetzung von 26S-Proteasomen sowie eine modifizierte mRNA-Expression von PA700-UE wurden in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium von Zellen oder in pathologischen Situationen beobachtet und deuten auf eine strukturelle Plastizität des PA700- Proteasomaktivators hin (Tokumoto et al. 1999; Wigle et al. 1999).

Um mögliche Isoformen des PA700-Komplexes zu identifizieren und mögliche Korrelationen zum Aktivitätszustand der Mikroglia nachzuweisen, habe ich damit begonnen, alle PA700-Untereinheiten in Mikroglia zu identifizieren. Da primäre Mikrogliazellen nur in begrenzten Mengen zur Verfügung standen wurde der indirekte Untersuchungsansatz einer gradientenfractionierten Proteomanalyse gewählt [6]. Lysate der Mikroglia-ähnlichen Zelllinie BV-2 (Boccini et al., 1992) wurden in Glycerolgradienten fraktioniert. Die 26S-Proteasom enthaltenden Fraktionen wurden über Messungen der Peptidaseaktivität identifiziert und in 2D-NEPHGE-Gelen getrennt. Aus diesen Gelen wurden alle isoliert liegenden Proteine identifiziert (Peptidanalyse über Sequenzierung und Massebestimmung: Dr. R. Kraft & Dr. E.-C. Müller, Max-Delbrück-Centrum, Berlin). Die Gelpositionen der identifizierten PA700-UE aus BV-2-Zellen wurden als Referenz herangezogen, um PA700-UE in Immunpräzipitaten des 26S-Proteasoms primärer Mikrogliazellen zu identifizieren, die ebenfalls in 2D-NEPHGE-Gelen aufgetrennt worden waren. Dieser indirekte Ansatz ermöglichte es uns, aus geringen Mengen primärer corticaler Mikrogliazellen neonataler Mäuse (9×10^6 Zellen) die Zusammensetzung des 26S-Komplexes unter verschiedenen, aus immunologischer Sicht interessanten, Szenarien zu untersuchen [6].

IFN- γ und LPS spielen bei inflammatorischen Reaktionen des ZNS eine große Rolle. Daher sollte ihre Wirkung auch auf die Zusammensetzung und mögliche Funktionsveränderungen des 26S-Proteasoms in Mikroglia untersucht werden. Wir konnten in Mikroglia die Induktion eines 50-kDa-Proteins durch LPS beobachten, welches als Bestandteil des PA700 Komplexes koimmunpräzipitierte. Unter IFN- γ -Behandlung oder in Kontrollansätzen trat dieses Protein, bei dem es sich entweder um eine PA700-Untereinheit oder ein transient assoziiertes Protein handelt, nicht auf [6].

Funktionelle Analyse von Proteinen der PA28-Familie

Die IFN- γ -induzierbaren Proteine PA28 α und PA28 β wurden als Komponenten des 11S-Regulators gereinigt (Dubiel et al., 1992). Ein drittes Mitglied der PA28-Familie, das PA28 γ -Protein, wurde ursprünglich als nukleäres Ki-Autoantigen in Patienten mit systemischem Lupus erythematosus beschrieben (Tojo et al., 1981; Nikaido et al., 1989; Nikaido et al., 1990). Biochemische und zellbiologische Studien ergaben bisher nur wenig Aufschluß über mögliche Funktionen von PA28 γ (Soza et al., 1997; Tanahashi et al. 1997; Realini et al., 1997).

Wie in diese Arbeit und in Publikationen anderer Arbeitsgruppen gezeigt wird, bilden alle drei PA28-Proteine heteromere (PA28 $\alpha_3\beta_3$: Song et al. 1996; PA28 $\alpha_3\beta_4$: Zhang et al. 1999) oder homomere 11S-Assemblierungsprodukte (PA28 α_7 : Johnston et al. 1997; PA28 γ_6 /PA28 γ_7 : Tanahashi et al., 1997), die verschiedene Peptidaseaktivitäten des 20S-Proteasoms stimulieren können (Kühn & Dahlmann, 1996a; 1996b; Realini et al. 1997).

Ogleich einige der hier dargestellten Ergebnisse hinsichtlich der Komplexbildung und Stöchiometrie von PA28-Aktivatoren, der Stimulierung von Peptidaseaktivitäten, und der Mutagenese putativer funktioneller Proteindomänen (Zhang et al. 1998a-c) die genannten Studien in einigen Aspekten bestätigen, enthält die vorliegende Untersuchung auch neue Erkenntnisse zum Mechanismus der Proteasomaktivierung durch Proteine der PA28-Familie. Es bestehen hinsichtlich der methodischen Ansätze und auch bezüglich der gezogenen Schlußfolgerungen erhebliche Unterschiede zu den genannten Publikationen.

Die intrazelluläre Lokalisation der PA28-Proteine wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Basierend auf Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden PA28 α und PA28 β in Cytosol und Nukleus nachgewiesen, während das PA28 γ -Protein im Nukleus lokalisiert ist (Soza et al., 1997). Das PA28 β Protein scheint verstärkt mit den Nukleoli assoziiert zu sein. In Zellfraktionierungsexperimenten wurde hingegen für PA28 γ eine ausschließlich cytosolische Lokalisation dokumentiert (Wojcik, 1999). Zur Komplikation des Bildes trägt bei, daß Isoformen von PA28 β (Zaiß & Kloetzel, 1999) und von PA28 γ (Albertsen et al. 1994) entdeckt wurden.

Die im Folgenden geschilderten Untersuchungen stellen einen Beitrag zum Verständnis der Funktionen und Wirkungsmechanismen der Proteine der PA28-Proteinfamilie dar.

3.1. Funktionsanalyse der PA28a- und PA28b- Proteine

3.1.1. Nachweis von PA28-20S-PA700 Komplexen in B8-Fibroblasten

Der Abbau von ubiquitinierten Proteinen wird vom 26S-Proteasom katalysiert. Die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation wird durch Überexpression der PA28 α -Untereinheit, die ein Proteasom-aktivierendes Heptamer bilden kann, optimiert (Groettrup et al., 1996b; Johnston et al., 1997; Knowlton et al., 1997). Da antigene Peptide im Cytosol nur sehr schwer nachzuweisen sind, nämlich dann, wenn sie an stabilisierende Proteine gebunden sind, stellt sich die Frage, wie Proteindegradation

durch das 26S-Proteasom und optimierte Peptidprozessierung durch PA28-aktivierte 20S-Proteasomen kooperieren. Damit generierte Epitope nicht von cytosolischen Peptidasen zerstört werden, muß ein lückenlose Transportkette der Epitope ins ER sichergestellt sein.

Hendil et al., (1998) konnte erstmals PA700-20S-PA28-Komplexe in IFN- γ -induzierten Helazellen mittels Immunpräzipitation nachweisen. Da der Nachweis dieser makromolekularen Maschine zur Epitopprozessierung von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der koordinierten Funktionen beider Proteasomaktivatoren ist, wurde ein analoges Immunpräzipitationsexperiment aus B8-Fibroblastenlysaten vor und nach Induktion mit IFN- γ durchgeführt (Abb. 4). Aus den B8-Lysaten wurden in Gegenwart von ATP und Glycerol, hochmolekulare Komplexe immunpräzipitiert, die die SUG1-ATPase (p45) des PA700-Komplexes enthalten.

Die Auswertung der Autoradiogramme in Abb. 4 zeigt, daß sowohl konstitutive als auch Immunoproteasomen in Assoziation mit dem PA700-Komplex präzipitiert werden. Eine Präferenz für die Bindung der einen oder anderen 20S-Subpopulation ist nicht erkennbar. Diese Option erschien möglich, da kooperative Effekte für die Assemblierung des 26S-Proteasoms beschrieben wurden (Adams et al. 1997). Ein Vergleich des kopräzipitierten 20S-Proteasoms mit aufgereinigtem 20S-Proteasom (hier nicht gezeigt) ergab einen wesentlichen Unterschied. Im Bereich der C8-Untereinheit liegen in den Präzipitaten zusätzliche Proteinspots, deren Massen und isoelektische Punkte (IEPs) mit dem der PA28 α/β -Untereinheiten übereinstimmen. Die 2D-Gelposition dieser mutmaßlichen PA28 α und PA28 β -Proteine wurde im Westernblot verifiziert. Im Gegensatz zu Hendil konnten wir auch in uninduzierten Zellen PA28 in Assoziation mit 20S-PA700 nachweisen. Die PA28-Expression in Abwesenheit von IFN- γ ist in B8-Zellen sehr gering. Daher ist unklar, warum wir nach Induktion der Zellen mit IFN- γ keinen signifikanten Unterschied in der PA700-20S-gebundenen Menge an PA28 sehen.

Eine höhere Affinität des PA28-Komplexes zu konstitutivem Proteasom könnte eine Erklärung sein. Wie jedoch in Abschnitt 3.1.4 gezeigt wird, geben kinetische Messungen in vitro keinen Anlaß zu dieser Interpretation.

Der Nachweis einer Assoziation von PA28 mit Proteasekomplexen, die die Bindung und Entfaltung ubiquitinerter Proteine vermitteln, schließt eine wesentliche Lücke im Verständnis der Funktionen des Proteasoms im Rahmen der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation. Es bleibt nachzuweisen, ob der von Hendil in humanen Zellen und von uns in Maus-Fibroblasten nachgewiesene Komplex Proteinabbau und optimierte Epitop-Prozessierung kombinieren kann.

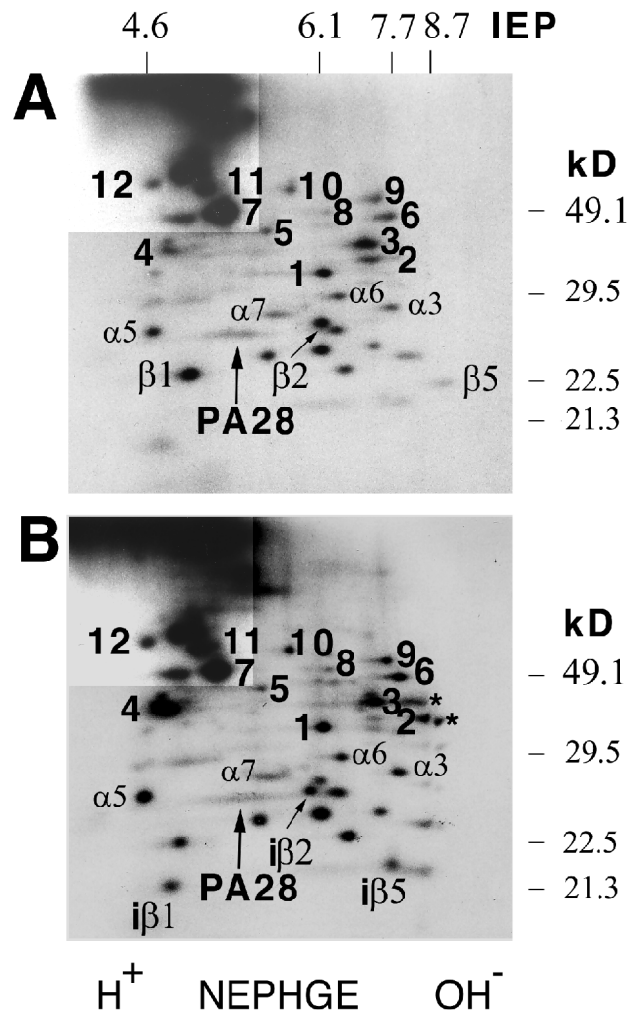


Abb.4: Immunpräzipitation von PA28-20S-PA700-Proteasomkomplexen aus B8-Fibroblasten. Ein monoklonales Antiserum, das die p45-ATPase-UE des Proteasomaktivators PA700 erkennt (Hendil et al. 1998), wurde zur Immunpräzipitation von Proteasomkomplexen aus Zellysaten eingesetzt. (A) Kontrollzellen und (B) IFN- γ -behandelte B8-Fibroblasten wurden parallel zur Cytokin-Induktion (50 U/ml) mit ^{35}S -Methionin/Cystein metabolisch markiert (5 h). Nach Zellyse in ATP-/Glycerol-Puffer (Abschnitt 5.6.2) wurden ca. 0.95×10^8 cpm (A) und 1.72×10^8 cpm (B) zur Präzipitation eingesetzt. Die koimmunpräzipitierten UE wurden autoradiographisch in 2D-Gelen detektiert und partiell identifiziert. Der linke obere Bildausschnitt wurde mittels graphischer Mittel (Adobe Photoshop 4.0) aufgehellt, um ein Erkennen überstrahlter Proteinsignale zu ermöglichen. Mutmaßliche UE des PA700-Regulators sind durch arabische Ziffern markiert. Einige α - und β -UE des 20S-Proteasoms sind ebenfalls benannt. Die Zuordnung der Position von PA28 erfolgte aufgrund der molekularen Masse und von Immunoblotanalysen mit dem PA28 α -spezifischen Antikörper K#39.4.

3.1.2. Überexpression von PA28 β und PA28 $\alpha\beta$ in B8-Fibroblasten

Einen großen Beitrag zum Verständnis der *in vivo* Funktion des Proteasomaktivators PA28 leisteten Studien zur Überexpression des PA28 α -Proteins in B8-Zellen (Groettrup et al., 1996a; 1996b) und Untersuchungen zur Generierung immundominanter Epitope durch PA28-aktivierte 20S-Proteasomen (Dick et al., 1996). In PA28 α -transfizierten B8-Zellen, die als weiteres Transgen das "immediate early"-Genprodukt pp89 exprimieren, wurde eine verbesserte Präsentation des H-2L^d-restringierten MHC-Klasse-I-Epitops beobachtet (Groettrup et al., 1996b). Diese Studie beantwortete jedoch nicht die Frage nach der Rolle des PA28 β -Proteins. Verschiedene Gruppen hatten der β -Untereinheit von PA28 ausschließlich stabilisierende Funktionen für heterohexamere PA28-Komplexe zugeschrieben (Kühn & Dahlmann, 1996b; Song et al. 1997). So war unklar, welchen Einfluß eine Überexpression von PA28 β oder von PA28 $\alpha\beta$ auf die Präsentation des pp89-Nonamers in transfizierten B8-Zellen haben würde. Die entsprechenden Transfektanten wurden daher im Rahmen einer Dissertationsarbeit etabliert (Soza, 1997). Die Charakterisierung dieser Transfektanten wurde von mir fortgeführt (Abb. 5). Da zum damaligen Zeitpunkt PA28 β ausschließlich als Stabilisator des 11S-Regulators betrachtet wurde und eine autonome Aktivierung von Aktivitäten des 20S-Proteasoms nicht beobachtet worden war (Kühn & Dahlmann, 1996b), war der Befund einer verbesserten MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation in PA28 β überexprimierenden B8-Zellen zunächst überraschend (Abb. 5). Die PA28 β - wie auch die PA28 $\alpha\beta$ -Transfektanten präsentierten das immundominante Epitop mit vergleichbarer Effizienz (Abb. 5A). Die Kontrolle der Oberflächenexpression von MHC-Molekülen (Abb. 5B) sowie die Abschätzung der "steady state level" und der Stabilität des pp89 Proteins (Abb. 5C; A. Soza, 1998; Dissertation) deutete auf einen Epitop-spezifischen Effekt, und nicht auf eine generell gesteigerte Degradation von pp89 oder einer Erhöhung der Oberflächenexpression von MHC-Molekülen.

Der Vergleich der Expressionsstärken von PA28 α - und PA28 β -Proteinen und der PA28 $\alpha\beta$ -Komplexe in B8-Transfektanten ergab schließlich eine mögliche Erklärung und ist in Abb. 5C-F dargestellt.

Die Westernanalyse (Abb. 5D und E) belegte die im Vergleich zur Kontrolle (- IFN γ) erzielte Überexpression von PA28 β in der PA28 β 5-Transfektanten und von PA28 α und PA28 β in der PA28 $\alpha\beta$ -13-Transfektanten. Überraschend war jedoch, daß alle PA28 β -Transfektanten eine erhöhte Expression von PA28 α aufwiesen. Die Northernanalyse (Abb. 5F) bestätigte diesen Befund und deutet an, daß mit den selektierten PA28 β -Transfektanten solche Klone isoliert wurden, die eine erhöhte Expression von PA28 α aufweisen.

Die Vermutung, daß die verbesserte Antigenpräsentation der PA28 β -Transfektanten auf eine erhöhte Expression von PA28 $\alpha\beta$ -11S-Komplexen zurückzuführen ist, wurde durch Koimmunpräzipitation von PA28 $\alpha\beta$ mittels eines PA28 α -spezifischen Antiserums bestätigt (Abb. 5G; A. Soza, 1998; Dissertation). Eine Funktion von PA28 β kann *in vivo* offensichtlich nicht isoliert von der PA28 α -Funktion untersucht werden, da die Überexpression von PA28 β zur Selektion von Transfektanten führt, die sowohl PA28 β als auch PA28 α überexprimieren.

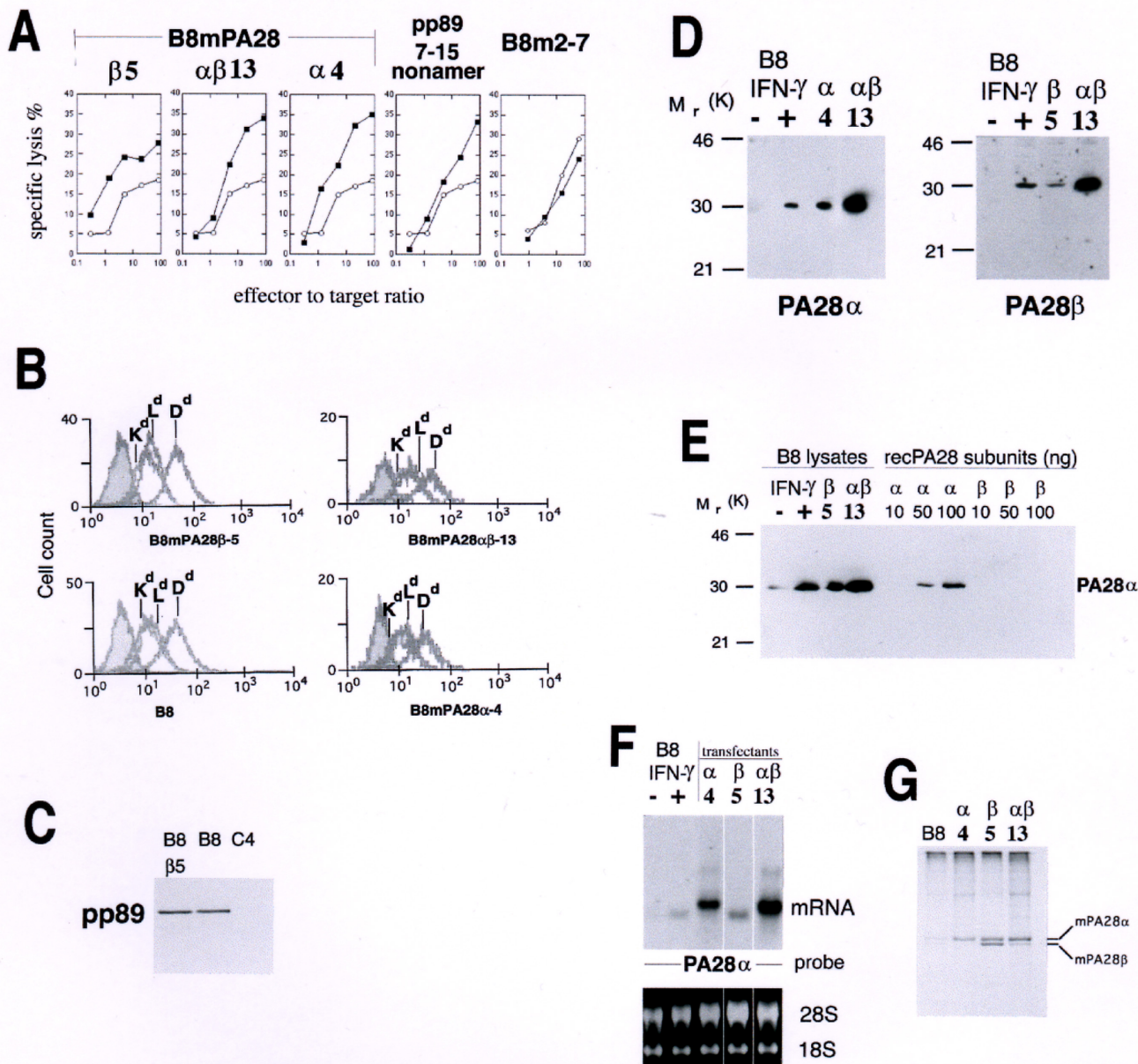


Abb. 5: Molekulare Ursachen einer verbesserten MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation nach Transfektion von B8-Zellen mit PA28β und PA28αβ. (A) Cytotoxischer T-Zell-Assay (CTL). (B) Durchflußcytometrische Analyse von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von B8-Fibroblasten. (C) Immunpräzipitation von pp89. C4-Zellen sind die Vorläuferlinie von B8-Zellen und enthalten kein pp89-Expressionskonstrukt. (D) Westernblotanalyse der Transfektanten. (E) Semiquantitative Westernblotanalyse. (F) Northernanalyse. (G) Immunpräzipitation von 11S-Komplexen aus Gradienten-fraktionierten Lysaten von PA28-Transfektanten. PA28α und PA28β konnten in Gradientengelen (Schägger & Jagow, 1987) separiert werden. Weitere Erläuterungen im Text.

3.1.3. Rekonstitution von PA28-Proteasom-Aktivatorkomplexen *in vitro*

Der Proteasomaktivator PA28, ein 11S-Komplex, der aus den IFN- γ -induzierbaren Untereinheiten PA28 α und PA28 β zusammengesetzt ist, wurde ursprünglich als allosterischer Aktivator der Peptidaseaktivitäten des Proteasoms beschrieben (Dubiel et al. 1992). Die Aufreinigung dieses Proteasomregulators aus Geweben ist sehr aufwendig und mit niedrigen Proteinausbeuten verbunden. Außerdem verliert natives PA28 bei Lagerung auf Eis sehr schnell seine proteasomaktivierende Kapazität. Daher etablierte ich ein Rekonstitutionssystem, um die Funktionen der PA28-Untereinheiten *in vitro* zu untersuchen.

Die Maus-cDNAs der PA28 α - und PA28 β -Gene wurden in den prokaryontischen Expressionsvektor pGEX kloniert und in *E. coli* exprimiert (Abb. 6A). Nach Induktion der Genexpression mit IPTG wurden die Bakterien lysiert und die Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteine entsprechend dem Schema in Abb. 6B affinitätschromatographisch gereinigt.

Wie in Abb. 6C zu sehen, besteht das Eluat zu ca. 95% aus gereinigtem recPA28-Protein. Die limitierte Proteolyse der Fusionsproteine mit Thrombin setzt die recPA28-Proteine ohne unerwünschte Degradation frei. Der GST-Fusionsanteil bleibt hierbei an die Glutathion-(GT)-Agarose gebunden. Thrombin wurde ebenfalls affinitätschromatographisch über Bindung an Streptavidin entfernt. Gereinigte recPA28 α - und recPA28 β -Proteine assemblieren zu 11S-Komplexen, wie mittels Glycerolgradientenzentrifugation (Abb. 6D / 6E) und Gelausschlußchromatographie (Abschnitt 3.2.2, Abb. 14C) gezeigt werden konnte. Die Assemblierung ist mit einer Steigerung des Aktivierungspotentials gekoppelt (Abb. 6D). Zwar bilden recPA28 α - und recPA28 β -Monomere auch 11S-Komplexe (Fraktion 7 in Abb. 6E) jedoch sind diese unter den gewählten Bedingungen des Glycerolgradienten weniger stabil.

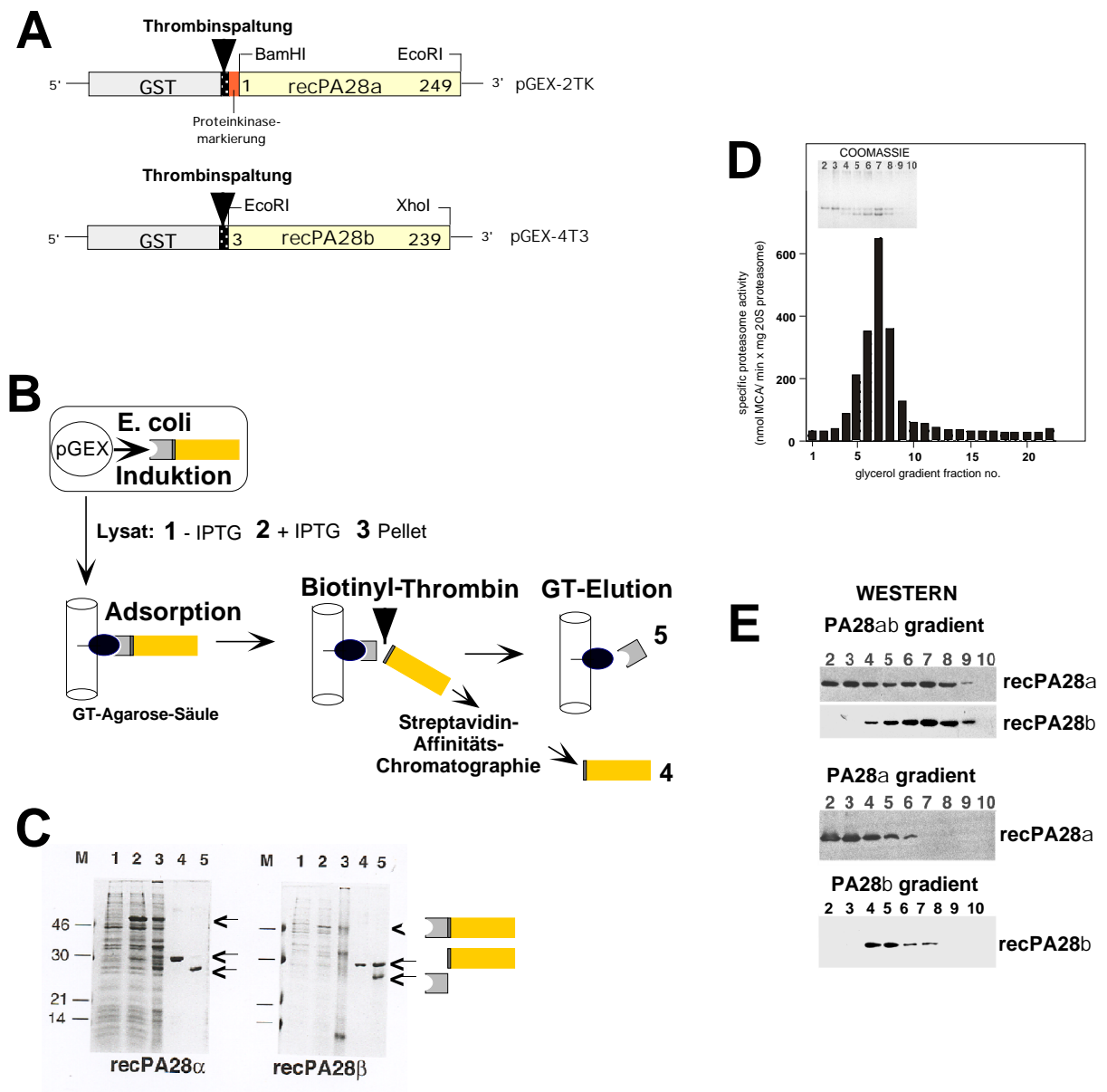


Abb. 6: Biochemische Charakterisierung rekombinanter PA28-Proteine.

pGEX-Plasmidkonstrukte zur Expression von PA28a und PA28b in *E. coli* (A). Aufreinigungsschema rekombinanter PA28-Untereinheiten (B). Qualitätskontrolle rekombinant aufgereinigter recPA28-Proteine; SDS-PAGE, Coomassiefärbung (C). Sedimentation assemblierter recPA28-Komplexe nach Glyceringradientenzentrifugation. Gemessen wurde die Aktivierung des 20S Proteasoms durch die recPA28-Proteinkomplexe der jeweiligen Fraktion. Das 20S Proteasom wurde zu den einzelnen Fraktionen nachträglich hinzugegeben. Die Untereinheiten recPA28a und recPA28b wurden in Gradientengelen aufgetrennt und mit Coomassiefärbung nachgewiesen (D). Westernanalyse von Fraktionen aus Gradienten, die nur mit PA28a oder PA28b oder mit beiden Proteinen beladen wurden (E). Weitere Erläuterungen im Text.

3.1.4. Assemblierungskinetiken der PA28a-, PA28b- und PA28ab-Komplexe

Um die Frage zu klären, ob konstitutive und Immunoproteasomen sich hinsichtlich der Bindung und Aktivierung durch PA28 unterscheiden, wurde die konzentrationsabhängige Aktivierung von 20S-Proteasomen aus B8-Zellen und aus LMP2/LMP7/MECL1-transfizierten B8-Fibroblasten (B27-Transfektante; [4]) untersucht (Abb.7). Die biphasische Abhängigkeit der Proteasomaktivierung in Gegenwart ansteigender Mengen rekombinanter PA28-Proteine (Abb. 7A und 7B) indizierte eine kooperative Assemblierungskinetik homomerer recPA28 α - und recPA28 β -Komplexe oder heteromerer recPA28 $\alpha\beta$ -Komplexe. Dieser Prozeß ist durch eine geringe Aktivierung durch PA28-Monomere und eine hohe, vollständige Aktivierung durch assemblierte Aktivatorkomplexe gekennzeichnet. Die kalkulierten Werte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Kinetische Parameter der Aktivierung von 20S-Proteasomen

	B8 PA28a	B27 PA28a	B8 PA28b	B27 PA28b	B8 PA28ab	B27 PA28ab
V _{mono}	4.56	1.41	26.82	20.29	2.97	2.97
V _{complex}	33.1	n. d. *)	169.36	117.17	136.9	64.2
K _{mono}	190.31	78.84	99.79	60.99	4.25	6.66
K _{complex}	16.41	n.d.	10.90	8.81	0.1	0.088
K _{ass}	5 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻³

Die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) des Umsatzes des fluorogenen Suc-VVLY-MCA Substrates durch Monomer-aktivierte (v_{mono}) und Komplex-aktivierte (v_{complex}) 20S-Proteasomen ist in nmole MCA/ min x mg 20S angegeben. Die Dissoziationskonstanten für drei Aktivierungsmodi (K_{mono}, K_{complex} für recPA28 α bzw. recPA28 β Aktivierung und recPA28 $\alpha\beta$ -Aktivierung) entsprechen den Konzentrationen an rekombinanten PA28 Untereinheiten in nM, die für eine halb-maximale Geschwindigkeit benötigt werden. Die Assoziationskonstante K_{ass} (in nM⁻¹) ist ein Maß der Affinitäten der α - α , β - β and α - β Interaktionen der Elementarreaktionen bei der Hexamer/Heptamerbildung durch recPA28 α , recPA28 β oder recPA28 $\alpha\beta$.

Ein Unterschied in den Aktivierungskinetiken der konstitutiven und der Immunoproteasom-subpopulationen wurde nicht festgestellt (Tabelle 1). Die Affinität des 20S-Proteasoms für recPA28 $\alpha\beta$ war zwei Größenordnungen höher als für die homomeren Aktivatorkomplexe. Homomere PA28-Komplexe wiesen eine um 10-fach höhere Affinität zum Proteasom auf als die monomeren Untereinheiten.

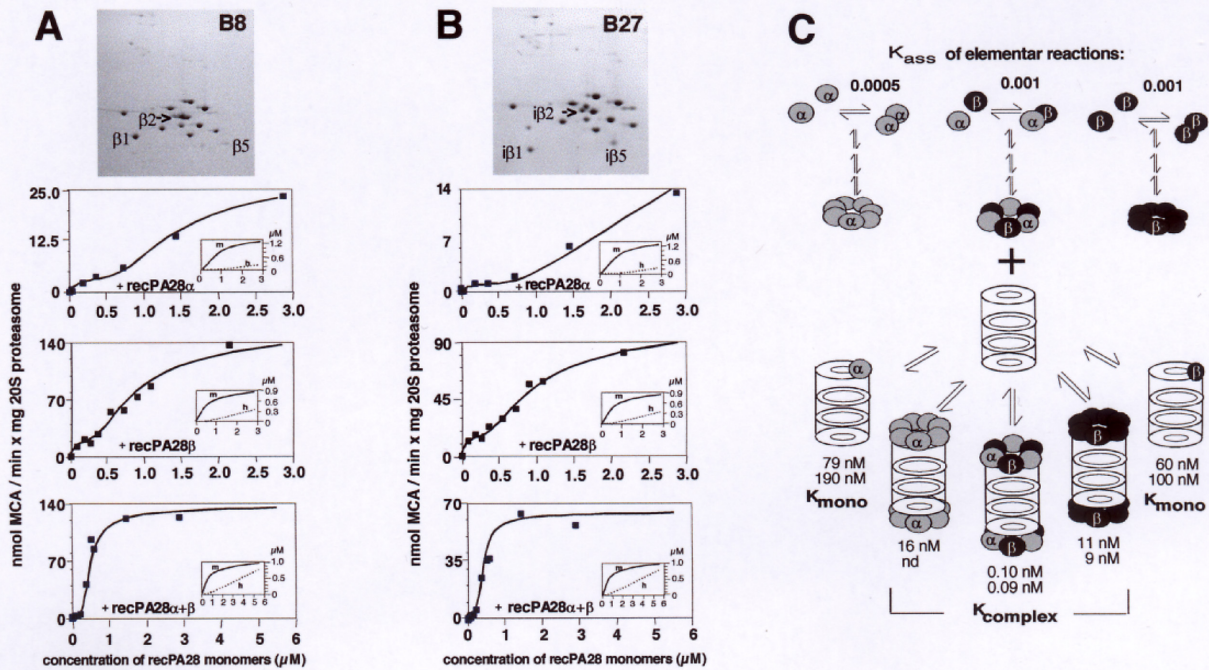


Abb. 7: Kinetische Modellierung der Assemblierung und Aktivierung von 20S-Proteasomen durch monomere und hexamere/heptamere Komplexe aus recPA28 α , recPA28 β und recPA28 $\alpha\beta$. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus drei Einzelmessungen. Der Anteil der verbliebenen Monomere (m) nach Assemblierung und der Hexamere/Heptamere (h) in Relation zur eingesetzten Menge an rekombinantem PA28-Protein ist ebenfalls dargestellt.

Konstitutive Proteasomen (A, NEPHGE von 20S-Proteasomen aus B8-Zellen) wie auch Immunoproteasomen (B, NEPHGE von 20S-Proteasomen aus B27-Transfektanten) werden durch recPA28 α , recPA28 β und recPA28 $\alpha\beta$ konzentrationsabhängig aktiviert. Die Coomassie-gefärbten 2D-Gele demonstrieren die Substitutionen von konstitutiven "active site"-UE durch homologe Immuno-UE. Das Bindungsschema in (C) faßt die kinetischen Parameter von fünf verschiedenen Aktivierungsszenarien zusammen. Dem Modell wurde die Annahme zugrunde gelegt, daß sowohl monomere recPA28-Proteine als auch die assoziierten oligomeren Komplexe zur Nettoaktivierung des 20S-Proteasoms beitragen können. Dieser Sachverhalt ist in der Geschwindigkeitsgleichung (1.1) zusammengefaßt:

$$v = \frac{v_m \frac{[PA28_m]}{K_m} + v_c \frac{[PA28_c]}{K_c}}{1 + \frac{[PA28_m]}{K_m} + \frac{[PA28_c]}{K_c}} \quad (1.1)$$

Die Subskripte (m) und (c) stehen für die monomeren bzw. die komplexierten Formen von PA28. Die Dissoziationskonstanten K_m und K_c sind ein Maß der Bindungsaffinitäten der respektiven PA28-Komplexe an das 20S-Proteasom. Die maximalen Aktivitäten Monomer- und Komplex-aktivierter Proteasomen sind als V_m und V_c ausgedrückt.

Die einfachste Variante des Modells, d.h. die ausschließliche Berücksichtigung der Monomer und Heptamer/Hexamer-Aktivierung unter Vernachlässigung von intermediären PA28-Komplexen des Typs PA28-UE₂₋₅, ergibt eine genaue Beschreibung der experimentellen Daten. Die in (C) aufgeführte Assoziationskonstante K_{ass} (nM) wurde für die Elementarreaktionen berechnet. Die kinetischen Modellierungen wurden von Prof. Dr. H.-G. Holzhütter auf der Basis meiner experimentellen Daten durchgeführt. Experimentelle Details in Abschnitt 5.2.3.

Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß konstitutive (B8) wie auch Immuno-(B27)-Proteasomen ähnliche Kinetiken aufweisen. Daraus folgt, daß die Inkorporation der IFN- γ -induzierbaren Untereinheiten keine globalen Konformationsänderungen verursachen, die Einfluß auf die Bindung von PA28 haben. Möglicherweise gilt auch der Umkehrschluß, daß Bindung von PA28 keine direkte oder indirekte Konformationsänderung bewirkt, die Auswirkungen auf die sechs aktiven Zentren hätte.

3.1.5. Translokationsmodell der Aktivierung des 20S-Proteasoms

Während der PA28-Aktivator in der Literatur unstrittig als allosterischer Proteasomaktivator betrachtet wird, besteht Uneinigkeit über den individuellen Beitrag der einzelnen Untereinheiten dieses Komplexes. Außerdem ist weitgehend unklar, wie die hexameren PA28 $\alpha\beta$ - oder die heptameren PA28 α -Komplexe eine Aktivierung des 20S-Proteasoms herbeiführen. Es wurde z.B. diskutiert, daß Bindung von PA28 konformationelle Veränderungen am 20S-Proteasom bewirkt, die sich bis ins Innere dieser Protease zu den aktiven Zentren fortpflanzen und dort veränderte Peptidaseaktivitäten bewirken. Konformationsänderungen konnten an 20S-Proteasomen nach Bindung makromolekularer Liganden gemessen werden (Conconi et al. 1999). Unsere kinetischen Daten stützen ein alternatives Modell. So könnte die Bindung der recPA28-Proteine die Aufhebung einer vermuteten sterischen Behinderung des Substrateintritts und/oder des Produktaustritts herbeiführen. Die experimentellen Belege eines solchen Modells sind in Abb. 8 und Tabelle 2 zusammengefaßt.

In Abhängigkeit vom verwendeten fluorogenen Substrat und vom Typ des recPA28 Komplexes ($\alpha,\beta,\alpha\beta$) zeigen Hydrolyserate und Peptidsubstratkonzentration eine deutlich sigmoide Anfangsbeziehung und einen abfallenden Verlauf bei höheren Substratkonzentrationen (Abb. 8A). Dieser Verlauf ist charakteristisch für Enzyme, die positive und negative Kooperativität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration aufweisen. Während in früheren Studien Aktivierungskurven mit hyperbolischem Verlauf- d.h. gleichbleibende K_m -Werte bei ansteigenden V_{max} -Werten beobachtet wurden (Realini et al., 1997) - konnten wir aufgrund einer größeren Anzahl von Meßpunkten im Niedrigkonzentrationsbereich einen sigmoiden Verlauf erfassen, der mit dieser einfachen Form einer Michaelis-Menten-Kinetik nicht zu beschreiben ist. Daher entwickelten wir ein alternatives katalytisches Modell (Bindungsschema: Abb. 8B und Geschwindigkeitsgleichung: Abb. 8C). Danach wird die Aktivität der aktiven Zentren im Inneren des 20S-Proteasoms durch Substratzufuhr oder Produktaustritt limitiert. Das latente Proteasom repräsentiert den Zustand minimaler Aktivität, vermutlich hervorgerufen durch sterische Behinderung des Eintritts von Substraten durch die aminoterminalen Enden der α -Typ-UE (Groll et al., 1997). In vitro kann die Latenz durch niedrige Konzentrationen von SDS oder durch Polylysin aufgehoben werden. Möglicherweise verändern diese Agentien die Konformation der Aminotermini und damit den Substrateintritt ins Proteasom. Eine mechanistische Interpretation unserer experimentellen Daten zur Wirkung kurzer fluorogener Substrate ist in Abschnitt (8D) dargestellt.

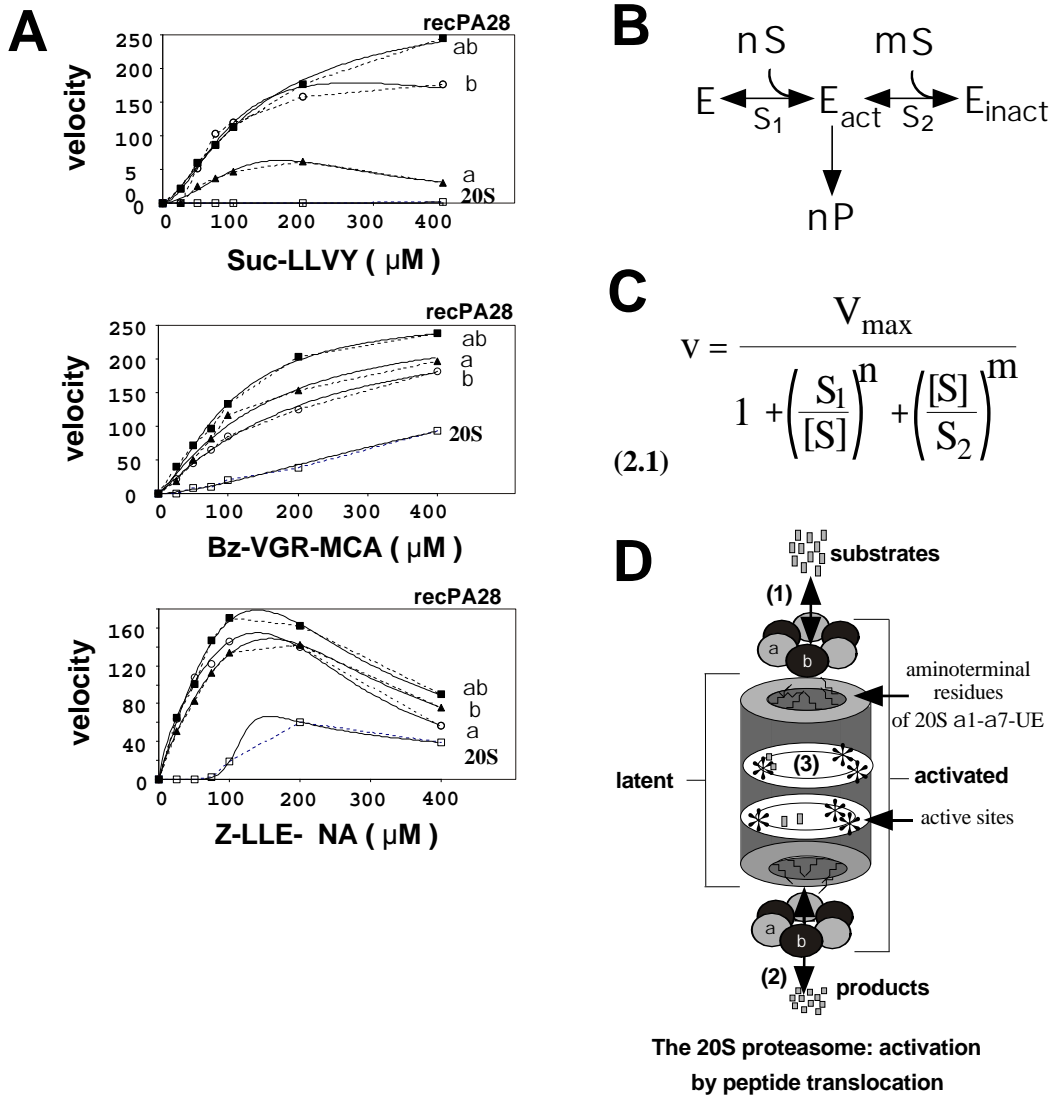


Abb. 8: Peptidtranslokationsmodell der Aktivierung des 20S-Proteasoms: recPA28a / b / ab vermitteln die Aktivierung der Hydrolyse fluorogener Peptide durch das 20S-Proteasom. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse verschiedener fluorogener Peptidsubstrate durch das 20S-Proteasom aus Leber der Maus ist als spezifische Proteasomaktivität dargestellt ("velocity" in nmole MCA oder bNA-Bildung/min pro mg 20S-Proteasom) (A). Die gepunkteten Linien verbinden die experimentellen Daten (Mittelwerte aus 3 Meßpunkten). Durchgezogenen Linien basieren auf einer kinetischen Modellierung gemäß dem in (B) gezeigten Bindungsschema und der Geschwindigkeitsgleichung (2.1; C). Die Bindung von n Substratmolekülen mit der halbmaximalen Bindungskonstante (S_1) überführt das latente 20S-Proteasom in die aktive Form. Bindung zusätzlicher (m) Substratmoleküle führt zur Inhibierung des Proteasoms. Die halbmaximale Substratkonzentration für diesen Schritt ist S_2 . Eine mechanistische Interpretation der experimentellen Daten ist in Abschnitt (D) dargestellt. Die kinetischen Parameter der Aktivierung des 20S-Proteasoms durch recPA28 Proteine sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Weitere Erläuterungen im Text und in Abschnitt 5.2.4.

Die Bindung von n Substratmolekülen mit der halbmaximalen Bindungskonstante (S_1) überführt das latente 20S-Proteasom in die aktive Form. Bindung zusätzlicher (m) Substratmoleküle führt zur Inhibierung des Proteasoms. Die halbmaximale Substratkonzentration für diesen Schritt ist S_2 . Das vorgeschlagene Peptidtranslokationsmodell ist der Träger-vermittelten erleichterten Substratdiffusion analog: Eintritt von Substratmolekülen (1) oder Austritt der Produkte (2) sind die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte proteasomaler Proteolyse. Die Substrathydrolyse an den sechs "active sites" im Inneren des Proteasoms (3) entsprechen dem "substrate sink" und dem "product source" für die Träger-vermittelte Diffusion zwischen proteasomalem Interieur und Exterieur. Die Bindung von Substrat an das latente Proteasom führt zunächst zu positiver Kooperativität. Bei hohen Substratkonzentrationen liegt negative Kooperativität vor. Der Proteasomaktivator PA28 aktiviert das latente 20S-Proteasom durch Reduktion der positiven Kooperativität oder durch Erhöhung der Substrataffinität. Unsere Interpretation wird von folgenden Ergebnissen unseres kinetischen Modells gestützt: Die gefitteten Kurvenverläufe der experimentellen Daten ergeben, daß die V_{\max} -Werte für latentes Proteasom und alle drei Arten der Aktivierung, d.h. mit recPA28 α , recPA28 β oder recPA28 $\alpha\beta$, nahezu gleich groß sind. Eine zweite Modellierungsrunde mit der Annahme gleicher V_{\max} -Werte, ergab die in Tabelle 2 zusammengefaßten Parameter und die gefitteten Kurvenverläufe in Abb. 8A.

Tabelle 2: Kinetische Parameter der Hydrolyse fluorogener Peptidsubstrate

	Suc-LLVY-MCA				Bz-VGR-MCA				Z-LLE-bNA			
	n	m	S_1	S_2	n	m	S_1	S_2	n	m	S_1	S_2
20S	8.1	nd	772	nd	1.5	nd	611	nd	8.3	0.7	183	0.5
+ a	1.6	1.7	279	109	1.2	nd	151	nd	0.8	1.8	4675	53
+ b	2.8	nd	88	nd	1.1	nd	208	nd	1.5	nd	9884	69
+ ab	1.2	5.4	181	8175	1.5	11.9	100	180 3	1.5	nd	1873	37
V_{\max}	296				267				3513			
r^2	0.93				0.96				0.98			

Die Aktivierung der Hydrolyse fluorogener Peptide (0-400 μ M Substrat) durch latentes 20S-Proteasom wurde in Gegenwart von recPA28 α , recPA28 β oder recPA28 $\alpha\beta$ gemessen. Die molaren Verhältnisse von 20S-Proteasom und rekombinanten Proteinen betragen 1.4 nM : 875 nM recPA28-Monomer und ermöglichen theoretisch die Assemblierung von 125 nM Heptamer oder 146 nM Hexamer. Unter Gleichgewichtsbedingungen fanden wir, daß nur 11% PA28 α - oder 35% recPA28 α + β -Monomere in PA28 α -Heptamere (18 nM) oder PA28 $\alpha\beta$ -Hexamere (51 nM) assemblierten. Für die jeweiligen Substrate sind die Maximalgeschwindigkeiten des Umsatzes identisch, unabhängig davon welcher Aktivierungsmodus vorliegt. Der Parameter (m) entspricht dem Hill-Koeffizienten der Substratbindung des inhibierten Proteasoms. Die halbmaximale Substratkonzentration S_2 entspricht der Konzentration, bei der das Proteasom halb-maximale Inhibierung aufweist. In Abhängigkeit von der Art des ausgewählten Substrates ist die inhibitorische Komponente groß (Z-LLE- β NA) oder nicht detektierbar (nd). Die Qualität der Modellierung kommt im Parameter r^2 (Bestimmtheitsmaß) zum Ausdruck. Ein $r^2=1$ bedeutet den perfekten Fit (statistische Methoden: siehe Abschnitt 5.2.6).

Wie aus der Konkordanz zwischen Messwerten (gestrichelte Kurven, Abb. 8A) und theoretischen Kurven (durchgezogene Linien in Abb. 8A) und dem hohen r^2 Wert (Tabelle 2) zu ersehen ist, stellt unser kinetisches Modell eine exzellente Beschreibung der experimentellen Ergebnisse dar. Unser Modell erklärt die Aktivierung durch recPA28-Komplexe entweder durch Abnahme der Kooperativität, die für latentes Proteasom unendlich groß ist, oder durch Zunahme der Substratbindungsaffinitäten. Welche Komponente größere Gewichtung erfährt hängt von der chemischen Natur des Substrates ab. So fällt beim Z-LLE- β Na Substrat die Kooperativitätsverminderung als Hauptkomponente der Aktivierung ins Gewicht. Hingegen wird die trypsin-ähnliche Aktivität durch Erhöhung der Substrataffinität bewirkt, während die Kooperativität nahezu unverändert bleibt (Tabelle 2). Unser kinetischer Ansatz deutet an, daß die PA28-Proteine möglicherweise Eigenschaften von Peptidtransportmolekülen haben. Ein erster experimenteller Hinweis auf eine solche Aktivität stellen "Yeast-Two-Hybrid"-Experimente dar, die eine hohe Affinität des PA28 α -Proteins zu kurzen Peptiden belegen (Abschnitt 3.3.2).

Abschließend muß betont werden, daß die Substratzufuhr *in vivo* wahrscheinlich über PA700 in Form intakter entfalteter Proteinsubstrate erfolgt. Daher erscheint es uns als wahrscheinlich, daß PA28 in chimären PA700-20S-PA28 Komplexen vor allem für den Export kleiner Peptidbruchstücke zuständig sein sollte, da deren Überschuß im Inneren des Proteasoms möglicherweise die aktiver Zentren blockiert.

3.1.6. Prozessierung eines pp89-Epitops durch PA28-aktivierte Proteasomen

Da kurze fluorogene Peptide keine repräsentativen physiologischen Substrate sind, wurde ein längeres Peptidesubstrat ausgewählt. Ein synthetisches 25-mer Peptid, welches ein immundominantes Nonamer-Epitop des pp89-Proteins des Maus-Cytomegalovirus (MCMV) enthält, wird von 20S-Proteasomen nur mit geringer Effizienz prozessiert. Aus eukaryontischen Zellen gereinigter PA28-Aktivator erhöht die Abundanz sogenannter Doppelschnittereignisse und führt zu einer vermehrten Bildung des Nonamerproduktes (Dick et al., 1996). Die Kinetik der Hydrolyse des pp89-25-mer-Peptides in Gegenwart rekombinanter PA28-Proteine (Abb. 9) belegt eindrucksvoll die Authentizität des von mir etablierten Rekonstitutionssystems der Proteasomaktivierung durch recPA28-Proteine. Es wird deutlich, daß recPA28 β nicht nur fluorogene Peptidaseaktivitäten aktiviert, sondern auch zur erhöhten Prozessierung des immundominanten 9-mers durch das 20S-Proteasom beiträgt. Die Produktbildungsraten in Gegenwart von recPA28 β sind allerdings etwas geringer als in Gegenwart von recPA28 α oder recPA28 $\alpha\beta$. Da die verschiedenen recPA28-Komplexe das Spektrum der Peptidprodukte nicht verändern, scheint der Prozessierungsmechanismus des Proteasoms durch den Aktivierungsprozess nicht verändert zu werden. Der Einbau von PA28 β in den PA28 $\alpha\beta$ -Komplex hat somit keine unmittelbare Auswirkung auf die aktiven Zentren. Die primäre Aufgabe der PA28-Aktivatoren scheint auch bei der Degradation des 25-mer-Substrates in einer Beschleunigung der Substrat-/Produkt-Translokation zu bestehen.

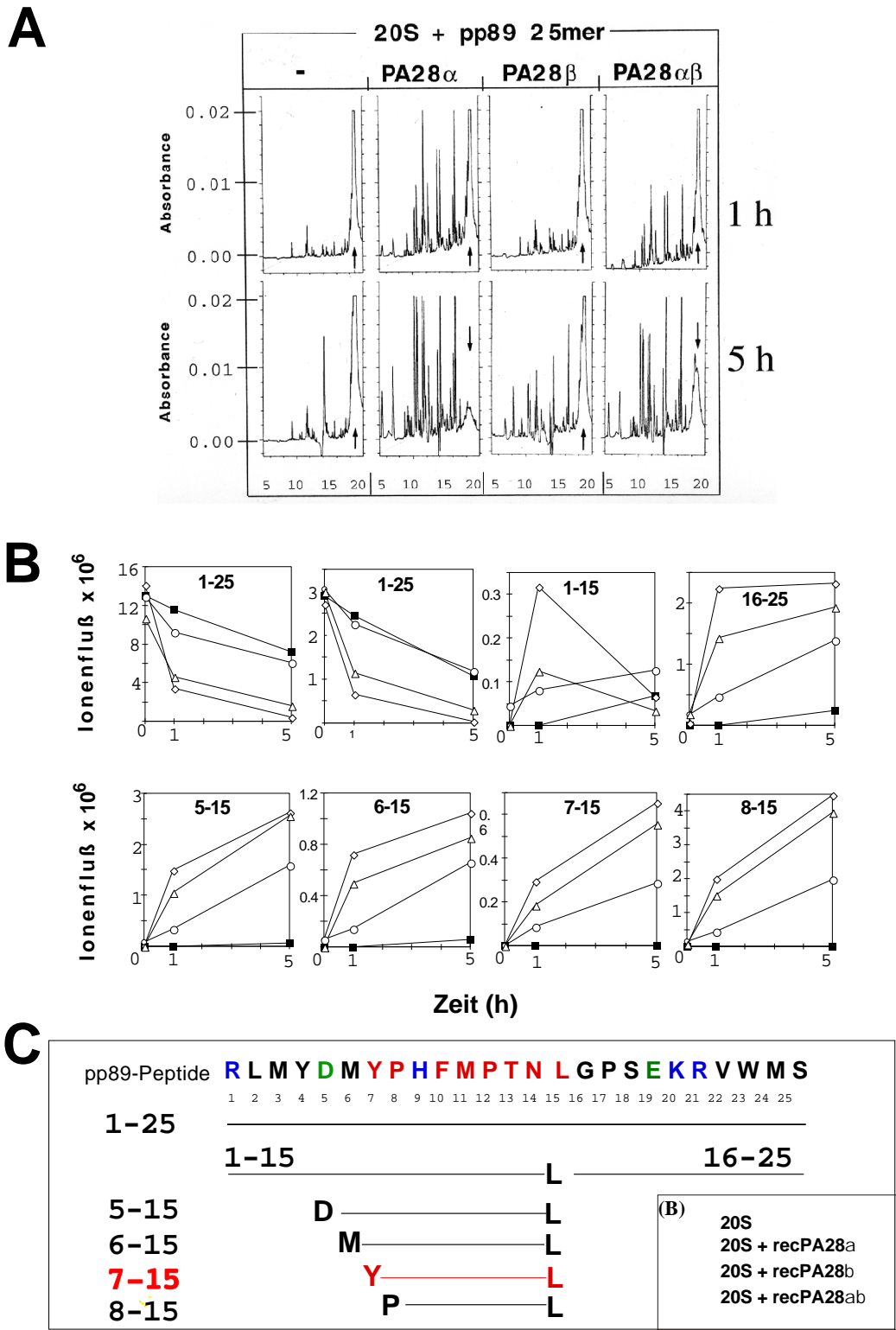


Abb 9: Proteasomale Schnittpräferenzen in Gegenwart rekombinanter PA28-Proteine. Analysiert wurde der Abbau eines synthetischen 25-mer Peptides, welches das nonamere, immundominante MHC-Klasse-I-Epitop des pp89-Proteins (Mauscytomegalovirus) enthält. (A) HPLC-Profile einer Peptiddegradationskinetik. (B) Massenspektroskopie der Produkte. Das 1-25mer -Substrat tritt in zwei Ladungsformen auf. (C) Schema nachgewiesener Produkte und Legende zu (B). Saure Aminos ure-reste sind in Grün, basische in Blau hervorgehoben. Das Nonamerepitop ist in Rot dargestellt.

3.1.7. Mutagenese des KEKE-Motivs der PA28 α -Untereinheit

Wie in Abb. 10A (Seite 33) zu sehen, sind die amino- und carboxyterminalen Bereiche der PA28-Proteine hochkonserviert. In einem zentralen Bereich hingegen befinden sich in allen drei Untereinheiten UE-spezifische Sequenzbereiche. Die PA28 α -spezifische Domäne ist das KEKE-Motiv, eine Lysin-und-Glutamat-reicher Sequenzabschnitt, der auch in den benachbarten Proteasom-UE α 4/C6 und α 3/C9 sowie in ca. 300 weiteren Proteinen gefunden wurde (Realini & Rechsteiner, 1996). Der KEKE-Domäne wurden spezifische Funktionen bei Protein-Protein-Interaktionen (PPI) unterstellt (Realini et al., 1994). Daher wurde ein Mutageneseansatz gewählt, um diese Hypothese zu prüfen. Es wurden ladungsneutrale Substitutionen der Lysinreste in Position 70, 72, 89, 90 und 91 durch Arginin (siehe Abb. 10A) über einen PCR-Mutageneseansatz (Abschnitt 5.1.1) in die PA28 α -UE eingeführt. Die verschiedenen Mutanten sowie das Deletionskonstrukt PA28 α Δ 70–91 wurden im "yeast two-hybrid"- (YTH)-System daraufhin getestet, ob sich Mutationen des KEKE-Motivs auf die Interaktionen PA28 α - PA28 α und PA28 α -PA28 β auswirken (Abb 11B, C; Seite 34). Eine weitere Deletionsmutante (PA28 β Δ 121-147) wurde nicht durch gezielte Mutagenese erhalten, sondern von D. Zaiß aus einer cDNA-Bank isoliert. Diese cDNA wurde ebenfalls in YTH-Vektoren umkloniert und auf Interaktion mit der PA28 α -UE untersucht (Abb. 11B, C). In Abb. 11A sind die "Yeast-Two-Hybrid"-Konstrukte und das Prinzip des YTH-Interaktionsassays am Beispiel der PA28 α -PA28 β -Interaktion skizziert. Methodische Details sind in Abschnitt 5.4 zusammengefaßt. Die Blaufärbung der Hefekolonien im β -Galaktosidasefilterassay (Abb. 11B) oder die photometrisch quantifizierte Freisetzung von o-Nitrophenol im Flüssigkulturassay (Abb. 11C) zeigt eine Interaktion der Domänen von GAL4-DB- und GAL4-AD-Fusionsproteinen an. Die notwendigen Negativkontrollen zur Vermeidung von Falschpositiven wurden nach Kriterien von Bartel et al. (1993) durchgeführt (Daten nicht gezeigt; methodische Details: Abschnitt 5.4).

Die in Abb. 11B und 11C dargestellten Ergebnisse belegen, daß weder die Deletion des PA28 α -spezifischen KEKE-Motivs, noch der hochkonservierten 121-146-Region in PA28 β eine Auswirkung auf die Interaktion von PA28 α und PA28 β haben.

Die Kristallstruktur des PA28 α -Heptamers (Knowlton et al., 1997) stand zum Zeitpunkt als diese Experimente durchgeführt wurden nicht zur Verfügung. So war nicht bekannt, daß das KEKE-Motiv Bestandteil einer Schleifenstruktur ist, die die obere Öffnung des PA28-Aktivators begrenzt (Abb. 10B). Daher bestand die Möglichkeit, daß das KEKE-Motiv die Interaktion mit den α -UE des 20S-Proteasoms vermittelt. Ebenfalls mit der YTH-Technik konnte ich zeigen, daß die Proteasom-UE α 4/C6 mit den Aktivator-UE PA28 α und PA28 β interagiert (Abschnitt 3.3). Im Verlauf dieser Experimente konnte auch gezeigt werden, daß das KEKE-Motiv nicht für die Interaktion mit der Proteasom-UE α 4/C6 erforderlich ist. (Daten hier nicht gezeigt).

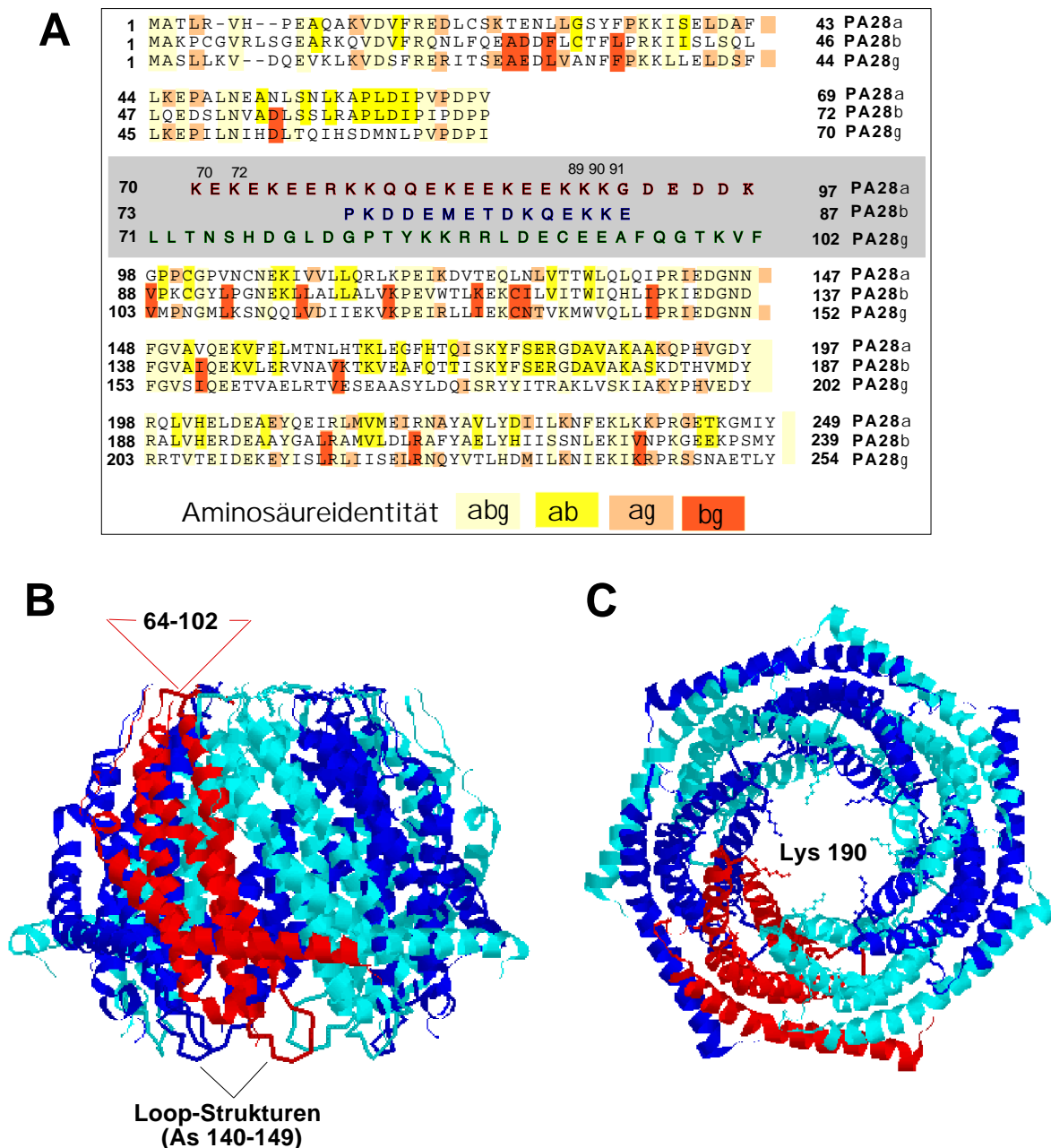


Abb. 10: Strukturelle Eigenschaften von Proteinen der PA28-Familie. (A) Vergleich der Primärstrukturen von PA28a, PA28b und PA28g (nach Kandil et al. 1997). Eine Untereinheiten-spezifische Region innerhalb der unstrukturierten, flexiblen Loop-Struktur an der oberen Aktivatoröffnung (As 64-102 in B) ist grau unterlegt (siehe auch Zhang et al. 1998c). (B) Ribbon-Modell der PA28a-Heptamerstruktur in der Seitenansicht. Der Loop 64-102 ist im Datensatz (1avo.pdb; (Knowlton et al. 1997) nicht enthalten. Die innerhalb PA28-Familie konservierte Loop-Struktur (As 140-149) ist für die Aktivierung des 20S-Proteasoms essentiell (Zhang et al. 1998b) (C) Aufsicht der PA28a-Heptamerstruktur: Der Öffnungsdurchmesser beträgt im oberen Bereich 20Å. Hier wird der Kanal von den sieben Lysinen in Position 190 gesäumt. Eine Passage gefalteter Proteine erscheint damit ausgeschlossen. Die dem 20S-Proteasom zugewandte Öffnung hat einen Durchmesser von 30Å.

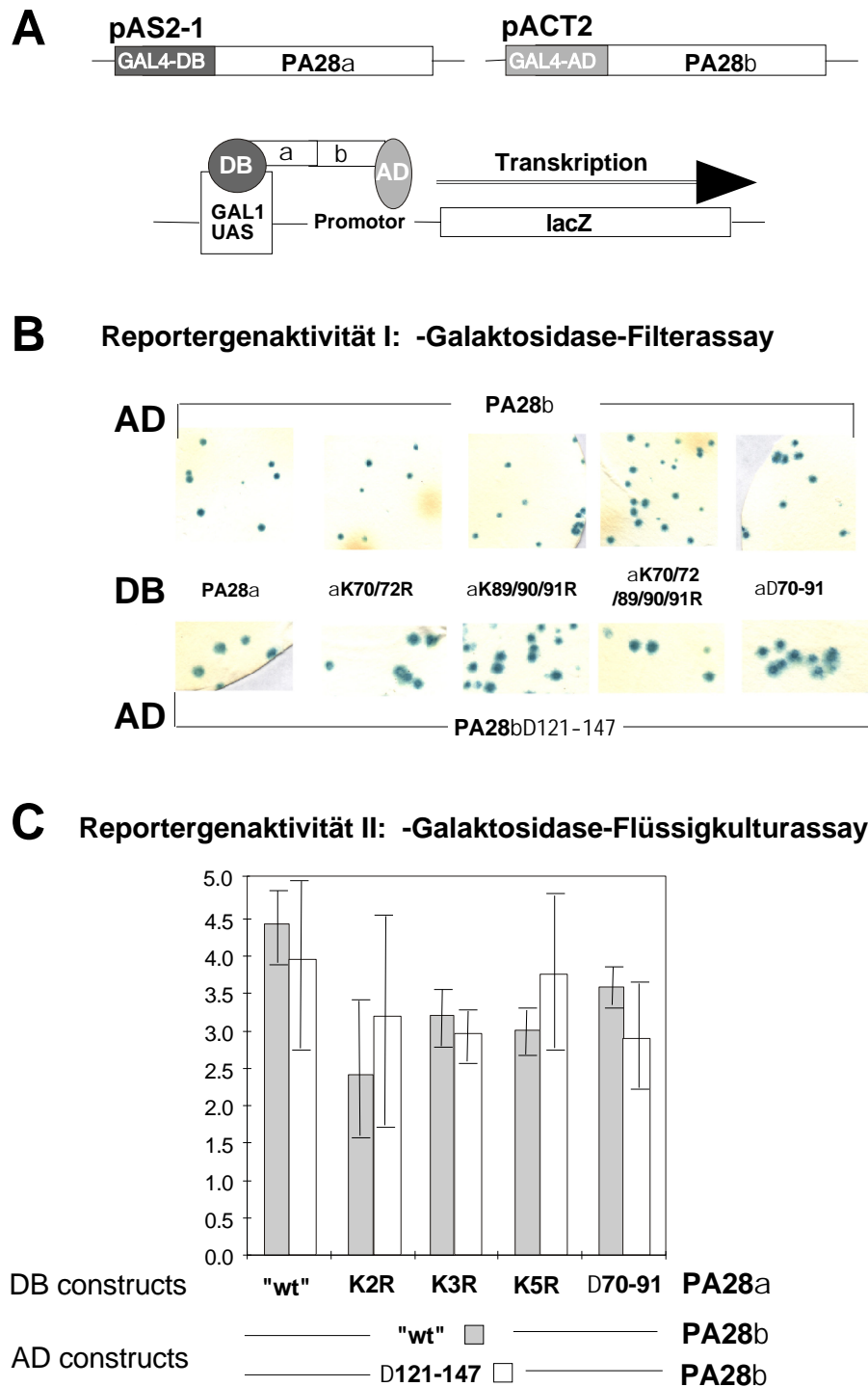


Abb. 11: "yeast two-hybrid"-Interaktionsstudie - PA28a-Mutagenese. (A) Schematische Darstellung des Testprinzips. Die cDNAs von PA28a und PA28b, (sowie Mutanten und Deletionskonstrukte) wurden in pAS2-1 und pACT2 Expressionsvektoren kloniert und in Hefe transfiziert. In Hefe werden Fusionsproteine der DNA-bindenden Domäne (DB) oder der Transaktivierungsdomäne (AD) des GAL4-Transkriptionsfaktors (TF) exprimiert und in den Nukleus transportiert. Interaktion der GAL4-Fusionsproteine rekonstituiert den GAL4-TF. Der TF aktiviert die GAL1-UAS ("upstream activating sequence") des lacZ-Reportergens. **(B)** Nachweis der -Galaktosidase-Aktivität im Filtertest. **(C)** Semiquantitative Bestimmung der b-Galaktosidaseaktivität in Hefelysaten.

3.1.8. Aktivierung des 20S-Proteasoms durch PA28 α 70-91

Nach Umklonierung der KEKE-deletierten cDNA in den pGEX-Vektor und Expression in *E. coli* wurde das recPA28 α 70-91-(Δ KEKE)-Protein gereinigt. Aktivitätsmessungen des 20S-Proteasom zeigten, daß die drei getesteten Peptidase-Aktivitäten auch nach Deletion von Aminosäure 70-91 von PA28 α aktiviert wurden (Abb. 12). Die Aktivierung der Hydrolyse von Substraten mit sauren und basischen P1-Resten war in den Deletionskonstrukten allerdings im Vergleich zum Wildtyp um ca. 150-300 Prozent erhöht. Aus den YTH-Experimenten und den Aktivierungsassays folgt daher, daß das KEKE-Motiv weder für die Interaktion der PA28-UE im PA28-Heterohexamer, noch für die Interaktion mit dem 20S-Proteasom essentiell ist. Darüberhinaus ist die aktivierende Funktion im Falle geladener P1-Reste gesteigert und im Falle der hydrophoben Schnittpräferenz reduziert.

Nach Abschluß dieser Untersuchungen stand die Kristallstruktur des PA28 α -Proteins zur Verfügung (Knowlton et al., 1997; PDB-Datenbank: 1avo.pdb). Mit Hilfe der RASMOL-Software wurde aus dem Datensatz 1avo.pdb ein in Abb 10.B dargestelltes "ribbon"-Modell generiert, um die Mutageneseresultate auf der Basis der Strukturdaten zu interpretieren. Die KEKE-Motive der sieben PA28 α -Monomere befindet sich innerhalb der unstrukturierten Schleifen (Aminosäurereste 64-102) am oberen Einlaß des PA28 α -Heptamers. Die Strukturdaten machen plausibel, warum die Deletion der KEKE-Region innerhalb dieses Schleifenbereichs nicht mit der Quartärstruktur des Heptamers interferiert und eine Aktivierung des 20S-Proteasoms weiterhin möglich ist. Da sich die deletierten KEKE-Regionen der sieben PA28 α -UE am oberen Eintrittskanal des Heptamers befinden (Abb. 12B), ist eine direkte Interaktion dieser Region mit den α -UE des 20S-Proteasoms ausgeschlossen. Unterschiede in der aktivierten Hydrolyserate für einzelne Peptidsubstrate stehen möglicherweise in Zusammenhang mit Peptid-bindenden und Peptid-translozierenden Eigenschaften des PA28-Komplexes. Die erhöhten Peptidaseaktivitäten des Proteasoms für Substrate mit saurem oder basischem P1-Rest nach Entfernung der ebenfalls durch positive und negative Ladungseigenschaften charakterisierten KEKE-Region (Abb. 12C) deutet darauf hin, daß im unmutierten Heptamer ionischer Wechselwirkungen den Substratzutritt im Vergleich zum Deletionskonstrukt vermindern.

Die hier dargestellten Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu Arbeiten aus dem Labor von M. Rechsteiner (Salt Lake City, Utah, USA). In der zitierten Studie wurden die PA28-spezifische Inserte von PA28 α , PA28 β und PA28 γ deletiert. Mit verschiedenen fluorogenen Peptidsubstraten, die jedoch nur in einer Konzentration eingesetzt wurden (200 μ M), wurden kein stimulierender Effekt nach Deletion des KEKE-Motivs beobachtet (Tab.1 in Zhang et al. 1998c). Aus einer Abbildung der gleichen Publikation wird jedoch deutlich, daß bei höheren Konzentrationen der rekombinanten Proteine sehr wohl ein schwach stimulierender Effekt zu sehen ist (Abb 2. in Zhang et al. 1998c).

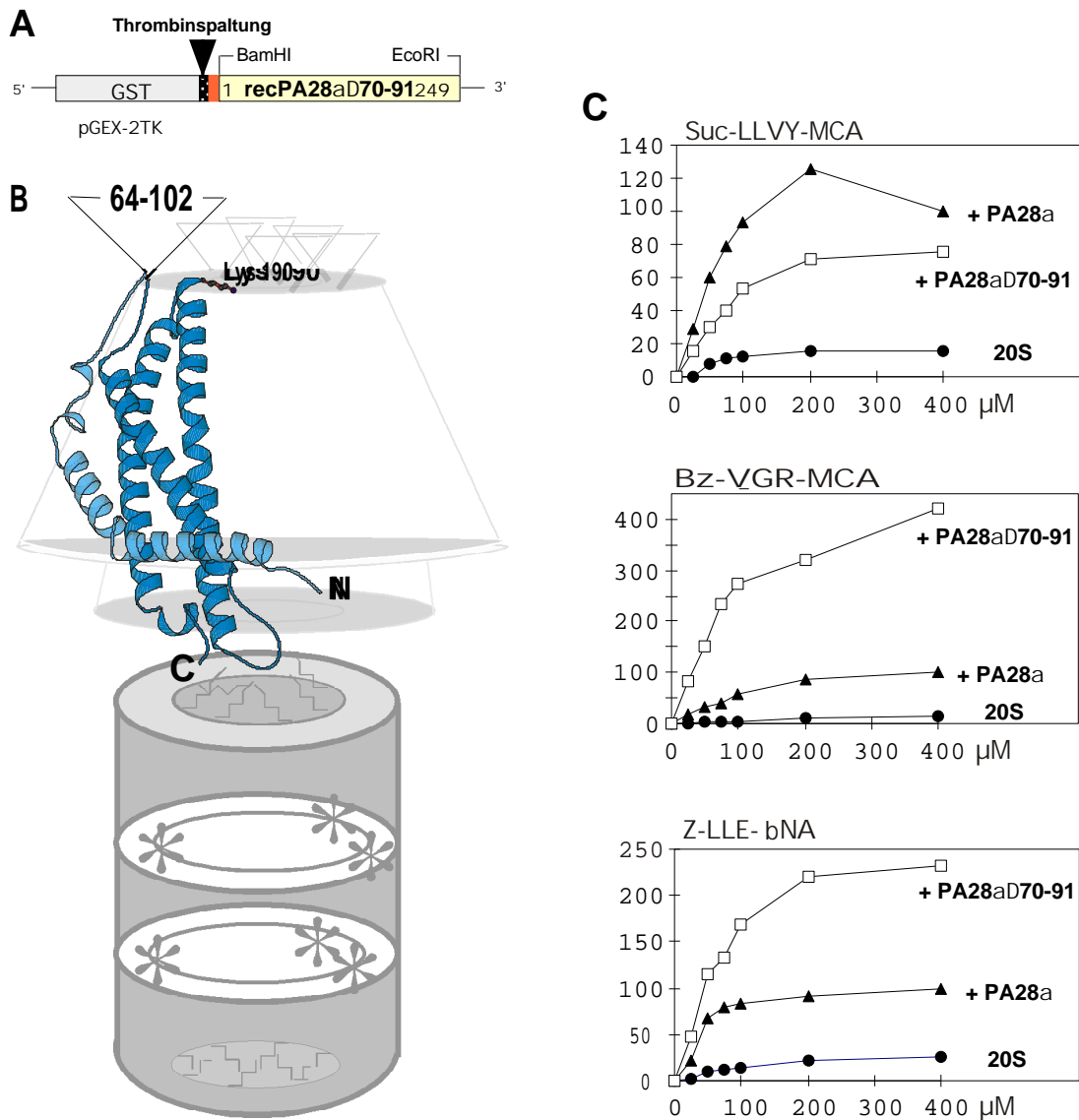


Abb. 12: Aktivierung des 20S-Proteasoms durch die KEKE-Deletionsmutante PA28aD70-91.

(A) pGEX-Plasmid zur Expression von rekombinantem (rec) PA28aD70-91 Protein in *E. coli*.

Das recPA28aD70-91 Protein wurde als GST-Fusionsprotein exprimiert, affinitätschromatographisch gereinigt und durch Thrombinprozessierung vom GST-Fusionsanteil freigesetzt. (B) Model der Interaktion von 20S Proteasom und PA28. Das Schema basiert im Wesentlichen auf den Strukturdaten von Knowlton et al. (1997) (1avo.pdb). Die Deletion des KEKE-Motivs betrifft eine Schleifenstruktur am Eingang (2 nm Durchmesser) des PA28 Aktivators. Das C-terminale Tyr und eine Loop-Struktur (As 140-149) sind für die Interaktion von PA28a mit dem 20S Proteasom essentiell (Ma et al. 1993; Zhang et al. 1998a). Eine Punktmutation in Asn-146 interferiert nicht mit der Bindung jedoch mit der Aktivierung des Proteasoms. (C) Spezifische Aktivitäten des latenten Proteasoms (in nmole Fluorogenfreisetzung / min x mg 20S Proteasom) nach Aktivierung durch recPA28a oder recPA28aD70-91. Bemerkenswert ist die verminderte Aktivierung der KEKE-Mutante für das Suc-LLVY-MCA Substrat. Für die beiden Substrate mit saurem und basischem P1-Rest wurde das Aktivierungspotential des PA28a-Aktivators nach Deletion der Aminosäuren 70-91 etwa 5x (100 μM Z-LLE-bNA) bzw 15 x (Bz-VGR-MCA) gesteigert.

3.2. Untersuchungen zur Funktion des PA28 γ -Proteins

Biochemischen und zellbiologischen Eigenschaften des PA28 γ -Proteins wie Lokalisation, Stabilität und Induzierbarkeit durch Zytokine sind in der Literatur umstritten (Soza et al. 1997; Wojcik, 1999; Tanahasi et al. 1997). Daher wurden diese Aspekte von mir erneut untersucht.

Welche Funktionen PA28 γ in der Zelle ausübt ist nicht bekannt. Es wurde ein Funktion in der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation angenommen. Für diese Arbeitshypothese spricht die Konservierung der Primärstrukturen innerhalb der PA28-Familie (Abb. 10; Kandil et al. 1997) und die nachgewiesene, optimierende Funktion von PA28 α bei der Prozessierung von Epitopen (Groettrup et al., 1995; Groettrup et al. 1996, Dick et al. 1996). Als Gegenargument kann angeführt werden, daß Homologe von PA28 γ in der Zecke *Rhipicephalus appendiculatus* und dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen wurden (Paesen & Nuttall, 1996; Kandil et al. 1997), also in Organismen, die keinen MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg besitzen. In diesem Kontext ist natürlich auch von Interesse, ob Interferon- γ einen Einfluß auf die Expression und Stabilität von PA28 γ hat. Ahn et al. (1995) hatte eine transiente Erhöhung des PA28 γ -mRNA-Gehaltes in IFN- γ -behandelten Zellen beobachtet.

3.2.1. Funktionen von PA28 γ in der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation

Um die genannten Aspekt einer zellulären Rolle von PA28 γ zu untersuchen, wurde das PA28 γ -Protein in B8-Fibroblasten überexprimiert und der Einfluß auf die Präsentation des MHC-Klasse-I-restringierten pp89-Epitops untersucht (Abb. 13).

Die PA28 γ -cDNA der Maus wurde in den Expressionsvektor pSG5 kloniert (Konstrukt von D. Zaiß) und gemeinsam mit einem Expressionskonstrukt für ein Hygromycinresistenzgen in B8 Fibroblasten transfiziert. In Westernblotanalysen wurde eine Überexpression von PA28 γ in B8-Transfektanten nachgewiesen (Abb. 13A). Eine Induktion des PA28 γ -Proteins durch IFN- γ wurde nicht beobachtet (Abb. 13A). In den PA28 γ -2/13H-Transfektanten wurde eine sehr geringe Erhöhung der PA28 β -Expression festgestellt (Abb. 13A, unten). Der cytotoxische T-Zelltest (CTL) belegt eine signifikant erhöhte Kapazität der PA28 γ -Transfektanten zur Präsentation des immundominanten pp89-Epitops (Abb. 13B). Die verbesserte Lyseaktivität der CTLs ist nicht auf eine unspezifische Erhöhung der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen zurückzuführen (Abb. 13C). Da die Stabilität des pp89-Proteins in der PA28 γ 2H-Transfektanten nicht signifikant verändert ist, kann eine verbesserte Antigenpräsentation nicht auf einen gesteigerten Abbau dieses Proteins zurückgeführt werden (Abb. 13D). Unsere Ergebnisse belegen eine spezifisch gesteigerte Präsentation eines MHC-Klasse-I-restringierten Epitops. Wie Abb. 13B allerdings auch zeigt, unterliegt die CTL-Aktivität in zwei unabhängigen Experimenten mit der PA28 γ 2H-Transfektante einer erheblichen Schwankung. Andererseits stimmen die CTL-Ergebnisse der PA28 γ 2H-Transfektante mit der Präsentationseffizienz einer zweiten Transfektante, PA28 γ 17H, sehr gut überein. Eine abschließende Beurteilung der Funktion des PA28 γ -Protein in der Antigenpräsentation wird möglich sein, wenn andere MHC-Klasse-I-restringierte Epitope untersucht worden sind.

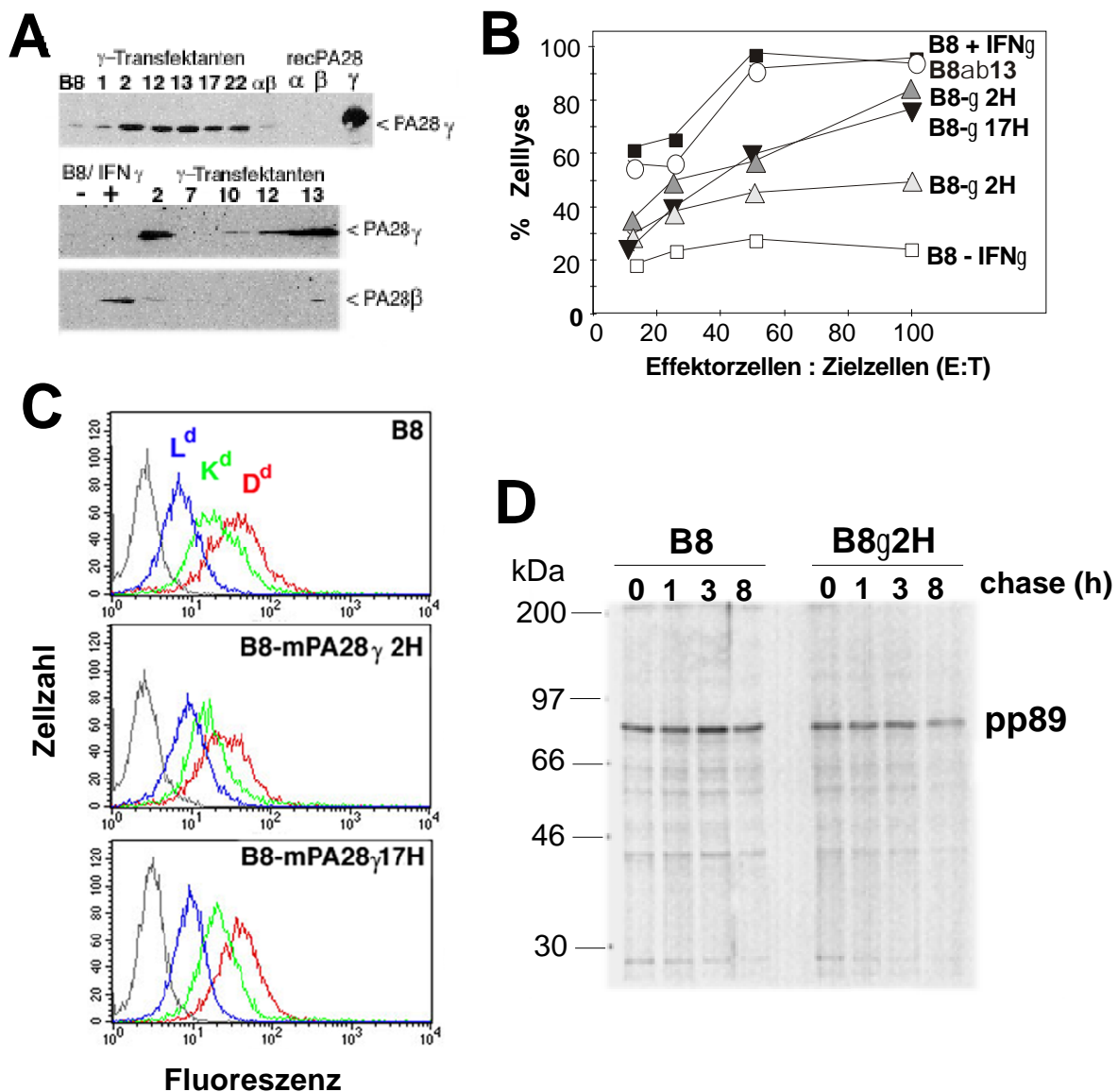


Abb. 13: Funktionsanalyse von PA28 γ in B8-Fibroblasten. (A) Immunoblotnachweis der Überexpression von PA28 γ in B8-Transfektanten. Als Kontrollen wurden Zellysate aus unbehandelten (-) und aus IFN- γ -behandelten B8-Zellen (+) aufgetragen. Die Spezifität des Antikörpers wurde mit recPA28-Proteinen verifiziert. Der untere Abschnitt der Abb. (A) belegt, daß PA28 γ im Gegensatz zu PA28 β nicht IFN- γ -induzierbar ist. In den Transfektanten PA28 γ 2/13H, die eine starke Überexpression von PA28 γ aufweisen, wurde eine leicht erhöhte Expression von PA28 β beobachtet. (B) Vergleich von pp89-spezifischen CTL-Aktivitäten gegenüber B8-Zellen, der B8-PA28ab13-Transfektanten und zwei B8-PA28 γ -Transfektanten. Die B8-PA28 γ 2H-Transfektante wurde in zwei unabhängigen cytotoxischen T-Zelltests eingesetzt. In beiden Experimenten wurde eine gegenüber der B8-Zelle erhöhte Lyseaktivität beobachtet. (C) MHC-Klasse I-Oberflächenexpression von B8-Fibroblasten und PA28 γ -Transfektanten. Die Transfektanten unterscheiden sich in der Expression von drei MHC-Klasse-I-Haplotypen nicht von B8-Fibroblasten. (D) Stabilität des pp89-Proteins in B8-Zellen und der B8-PA28 γ -Transfektanten.

3.2.2. Expression rekombinanter PA28 γ -Proteine (recPA28 γ)

Die in Kapitel 3.2.1 dargestellten Ergebnisse implizierten einen Mechanismus von PA28 γ als Aktivator und Modulator des 20S-Proteasoms. Daher wurde diese Hypothese *in vitro* überprüft.

Das humane PA28 γ -Protein wurde als GST-Fusionsprotein exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt. Das Aufreinigungsschema entspricht dem der rekombinanten PA28 α/β -Proteine (Abb. 6). Das Thrombin-prozessierte Protein (Abb. 14A, Spur 5) wurde einer Glycerolgradientenzentrifugation unterzogen. Ungefähr 40 % des PA28 γ -Proteins wurden im Immunoblot (Abb. 14B) in der 11S-Fraktion nachgewiesen (Frakt. 7-10). Eine gelausschlußchromatographische Analyse (Abb. 14C) belegte, daß es sich bei den beobachteten Komplexen tatsächlich um 11S-Komplexe mit vermutlich heptamerer oder hexamerer Stöchiometrie handelt. In einem Peptidaseaktivitätsassay (Abb. 14D) wurde die Aktivierung der Trypsin-ähnlichen Aktivität des 20S-Proteasoms durch die recPA28 γ -11S-Fraktion des Sephadex-Eluates nachgewiesen. Weiterer Peptidaseaktivität des 20S-Proteasoms unterliegen einer schwächeren Stimulierung durch recPA28 γ (Abb. 14E). Zusammenfassend betrachtet, ist das aktivierende Potential von recPA28 γ wesentlich geringer

als das der recPA28 $\alpha/\beta/\alpha\beta$ -Proteasomaktivatoren. Realini et al. (1997) machten, ebenfalls mit rekombinantem PA28 γ (REG γ), entsprechende Beobachtungen hinsichtlich des geringen Aktivierungspotentials. Es ist daher zu prüfen, ob die verbesserte Präsentation des pp89-Epitops (Abschnitt 3.2.1) tatsächlich auf eine optimierte Prozessierung durch PA28 γ -aktivierte 20S-Proteasomen zurückzuführen ist. Möglicherweise beeinflussen aber auch nukleäre Proteine das Aktivierungspotential von PA28 γ *in vivo*, so daß in unserem *in vitro*-Rekonstitutionssystem das wirkliche Aktivierungspotential von recPA28 γ nicht erfaßt werden kann. Einige Faktoren, die im nukleären Milieu eine Rolle spielen könnten, wie z.B. Gegenwart von DNA oder RNAs wurden im *in vitro*-System getestet (Daten nicht gezeigt), hatten jedoch keinen Einfluß auf die Aktivierungseigenschaften von recPA28 γ .

3.2.3. Nachweis von PA28 γ im Nukleoplasma von RMA-Zellen

Das geringe Aktivierungspotential von recPA28 γ *in vitro* kann dahingehend interpretiert werden, daß posttranslationale Modifikationen oder Interaktionspartner für *in vivo*-Funktionen erforderlich sind. Um die biochemischen Eigenschaften von recPA28 γ -Komplexen aus Zellen zu untersuchen, wurde eine Kernfraktionierung durchgeführt (Methoden: siehe Abschnitt 5.3). Es wurde die T-lymphoplastoide RMA-Zelllinie gewählt, da diese Zellen mit ausreichenden Erträgen leicht zu kultivieren sind.

Das Nukleoplasma wurde durch Glycerolgradientenzentrifugation weiter fraktioniert. Aktivatorkomplexe des Proteasoms wurden in Nukleoplasmafraktionen mittels verschiedener Antikörper nachgewiesen (Abb. 15). Die Lokalisation von 20S- und 26S-Fraktionen im Gradienten wurde über Peptidaseaktivitätsbestimmungen und den p31-spezifischen Antikörper verifiziert.

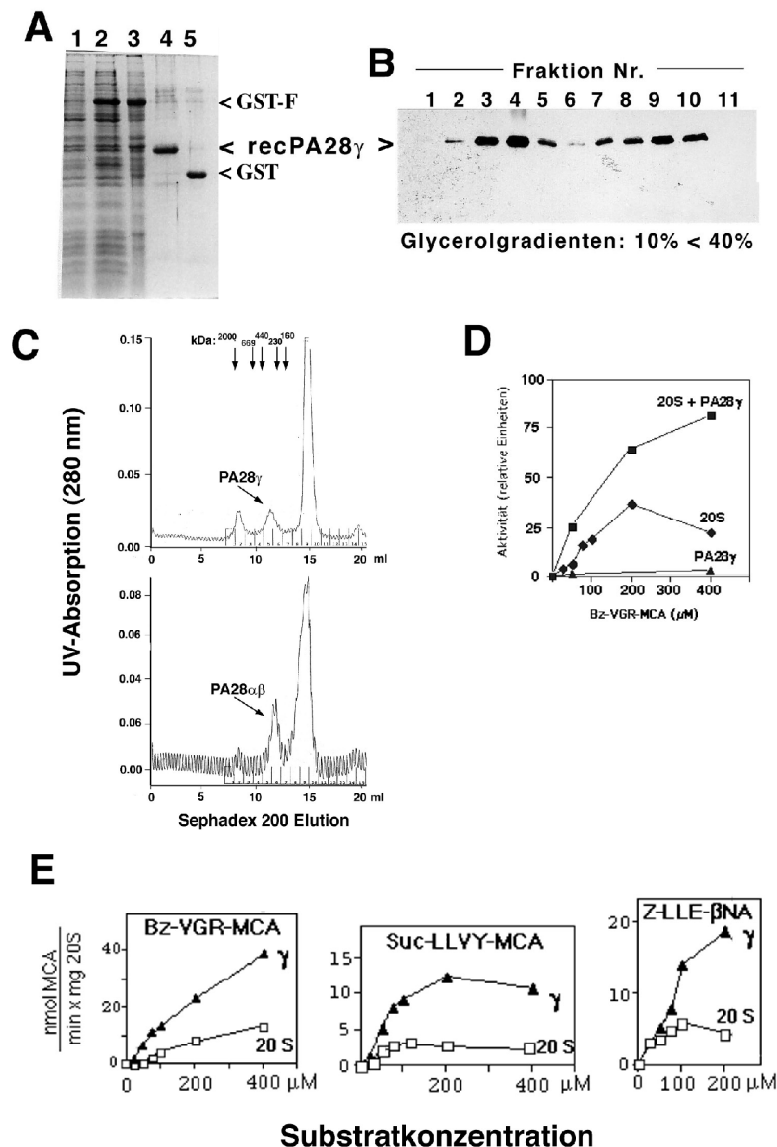


Abb. 14: Rekombinantes PA28g bildet 11S-Komplexe und aktiviert das 20S-Proteasom in vitro. (A) Expression von recPA28g in *E. coli*. Das SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) zeigt verschiedenen Aufreinigungsstufen: Lösliche Fraktionen bakterielle Lysate (1, ohne IPTG; 2, mit IPTG); unlösliche Fraktion nach Induktion (3). Markiert ist die Position des GST-Fusionsprotein (GST-F), PA28g-Eluat nach Thrombinschnitt (4); Glutathioneluat nach Thrombinschnitt (5). (B) Nachweis der Assemblierung von PA28g durch Glycerol-Dichtegradientenzentrifugation. Gezeigt wird eine Immunoblotanalyse mit dem PA28g-spezifischen polyklonalen Serum K#58.4. In Fraktion Nr. 7-10 werden 11S-Komplexe nachgewiesen. (C) Die Abschätzung der Komplexgröße wurde durch Gel-filtrationschromatographie (Sephadex 200) bestätigt. (D) Der 11S-Komplex aus rekombinantem PA28g aktiviert die Trypsin-ähnliche Aktivität des 20S-Proteasoms (100 ng 20S + 4 μ g recPA28g). (E) Nachweis der Aktivierung weiterer Peptidaseaktivitäten durch recPA28g (100ng 20S + 2.5 μ g recPA28g).

Eine japanische Arbeitsgruppe hatte eine Korrelation zwischen dem Verschwinden der PA28 γ -Expression und der IFN- γ -Konzentration in IFN- γ -transgenen Mäusen dokumentiert (Tanahasi et al., 1997). Daher wurden die hypotonische Kernfraktionierung (4×10^8 RMA-Kerne) sowohl mit, als auch ohne IFN- γ -Behandlung (72 h; 15 U/ml) der RMA-Zellen durchgeführt.

PA28 γ -Komplexe akkumulieren in den Fraktionen 4-15 mit der größten Intensität in der 11S Fraktion (Nr. 7-9). PA28 γ -Komplexe in den Fraktionen 13 - 15 kosedimentieren im Gradienten mit dem 20S-Proteasom oder anderen nukleären Komplexen dieser Größe. Eine Assoziation von 20S-Proteasom und PA28 γ konnte in Immunpräzipitationen aus Glycerolgradientenfraktionen gezeigt werden (Tanahashi et al., 1997).

Bemerkenswert sind die drei höhermolekularen Proteinbanden oberhalb der 32-kDa-Bande von PA28 γ , die mit dem PA28 γ -spezifischen Antikörper im Immunoblot kreuzreagieren (Abb. 15). Die 32-kDa Bande des PA28 γ -Proteins vermindert sich in ihrer Intensität in dem Maße, in dem die Intensität der Triplebanden zunimmt. Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, daß PA28 γ in der 20S-Fraktion hauptsächlich in modifizierter Form vorliegt. Phosphorylierungen oder eine Ubiquitinylierung mit einer 1-3 monomeren Ubiquitinmolekülen würde die Retardierung im Laufverhalten erklären. In der 26S-Fraktion sind die drei langsamer ins Gel einlaufenden, modifizierten Formen von PA28 γ , nur noch undeutlich zusehen. Anstelle der 32kDa Bande treten niedermolekulare Proteinfragmente von ca 23 kDa, also mutmaßliche Degradationsprodukte von PA28 γ auf.

Es fällt auf, daß die PA28 γ -Verteilung im Gradienten sich bei IFN- γ -induzierten Zellen von der in Kontrollen ohne IFN- γ unterscheidet, während die Verteilung von PA28 α identisch erscheint. Möglicherweise unterliegt die Lokalisation von PA28 γ im Nukleoplasma einer IFN- γ -sensitiven Umverteilung.

RMA-Zellen besitzen im Vergleich zu B8-Fibroblasten eine hohe konstitutive Expressionsrate von PA28 α & β . PA28 α und PA28 β wurden in der 20S-Fraktion (Nr. 13-17) und 26S-Fraktion (Nr. 18-21) Fraktionen nachgewiesen. Rekombinante PA28 α β Komplexe, die in Abwesenheit des 20S-Proteasoms über Glycerolgradienten zentrifugiert wurde, sind hingegen ausschließlich in Fraktion 7-9 zu finden (siehe Abb 6E). Daher korreliert dieses Ergebnis mit der Vorstellung, daß in der Nukleoplasmafraktion von RMA-Zellen PA28 α / β / α β in Assoziation an 20S und 20S-PA700 Komplexe vorliegen. Darüberhinaus finden wir PA28 α auch in der 11S Fraktion, PA28 β wurde hier nicht nachgewiesen, was möglicherweise auf eine geringere Sensitivität des PA28 β Antikörpers zurückzuführen ist. Eine andere Erklärung wäre, daß PA28 β , welches in Assoziation mit den Nukleoli beobachtet wurde (Soza et al., 1997), bei der Fraktionierung in geringeren Mengen ins Nukleoplasma freigesetzt wird, da es an nukleoläre Strukturen bindet.

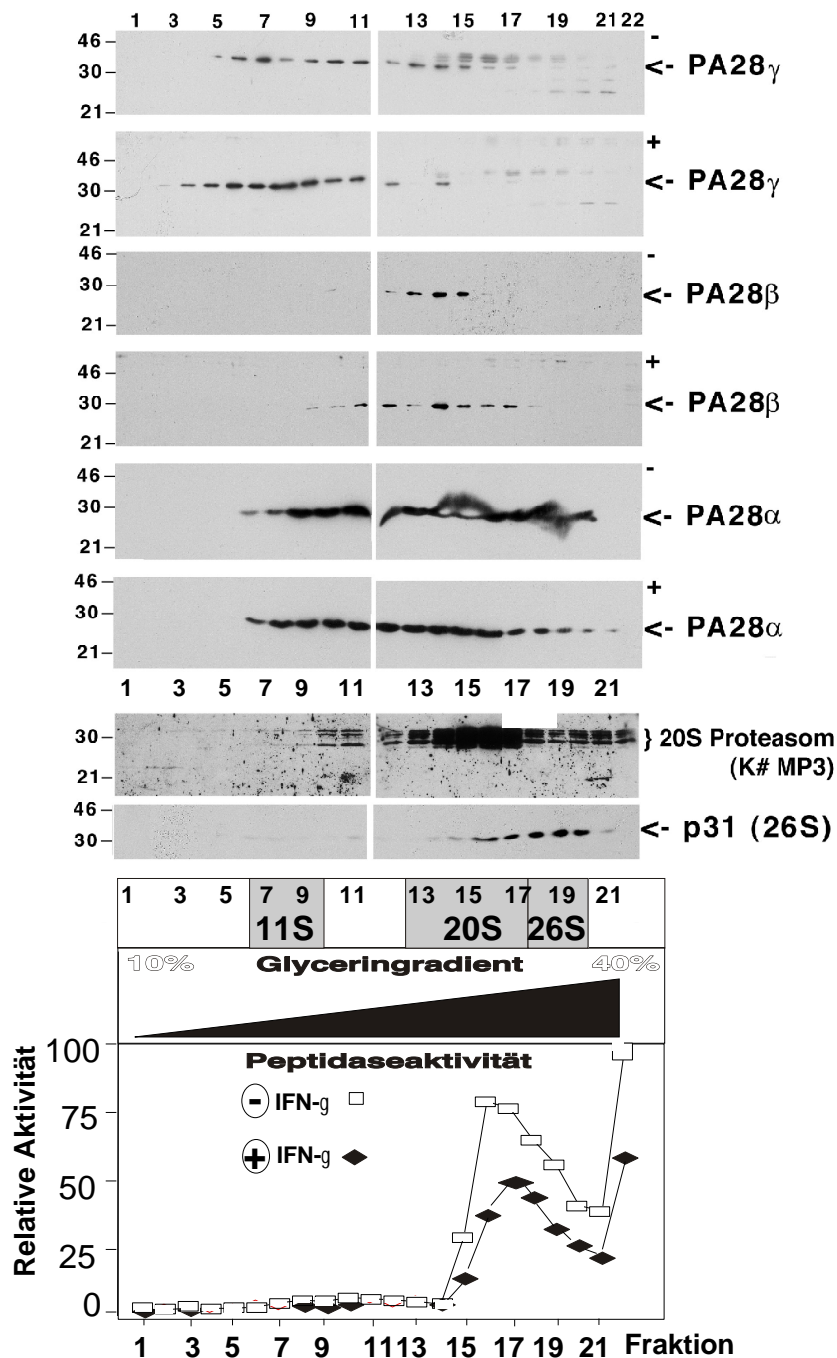


Abb. 15: Nachweis der Proteine der PA28-Familie im Nukleoplasma von RMA-Zellkernen. Die Immunoblotanalyse detektiert PA28a, PA28b und PA28g in 11S, 20S und 26S-Fractionen eines Glyceringradienten. Zellkerne aus IFN-g-induzierten und aus unbehandelten Zellen wurden über ein Saccharosekissen zentrifugiert. Die angereicherten, cytosolfreien Nuklei wurden unter Niedrigsalzbedingungen lysiert. Das Nukleoplasma wurde im Glycerolgradienten fraktioniert (Methoden in Abschnitt 5.3). Die Messung von Peptidaseaktivitäten (Suc-LLVY-MCA-Hydrolyse) in Kombination mit der Immunoblotanalyse proteasomaler Proteine (Antikörper K#MP3 für 20S-Proteasom und K#anti-p31 für PA700) ermöglichte die Zuordnung von S-Werten zu bestimmten Bereichen des Gradienten (Fraktions-Nr.).

3.2.4. Stabilität des PA28γ-Proteins in B8-Fibroblasten

Die PA28γ-kreuzreaktiven Proteinbanden in Glycerolgradientenfraktionen des Nukleoplasmas (Abb. 15) deuten möglicherweise auf eine Ubiquitinierung und Proteasom-vermittelte Degradation des PA28γ-Proteins. Daher wurden die Stabilität dieses Proteins und Einflüsse von IFN-γ in "pulse chase"-Experimenten untersucht (Abb. 16). Die Halbwertszeit des PA28-γ-Proteins in Transfektanten (>24 h - < 48 h) weist dieses Protein als relativ stabil aus (Abb. 16B). Die Halbwertszeit der PA28α/β-Proteine wurde von Ahn et al. (1996a) mit 33-40h angegeben. Eine kurze IFN-γ-Induktion von B8- oder B8-PA28γ2H-Zellen (Abb. 16A) hat ebenso wie eine Langzeitinduktion (Abb. 16B) keine Auswirkungen auf die PA28γ-Menge in Zellysaten nach einstündigem "pulse". Daher ist auszuschließen, daß das PA28γ-Protein durch dieses Cytokin induziert wird. Im Gegensatz zu Tanahashi et al. (1997) konnte ich jedoch auch keinen deutlichen Einfluß von IFN-γ auf die Abbaurate dieses Proteins feststellen. Allerdings scheinen die PA28γ-Mengen nach 4 h "chase" in Gegenwart von IFN-γ etwas vermindert zu sein. Dieser Trend bestätigt sich jedoch nicht im Langzeitexperiment. Hier scheint nach IFN-γ-Induktion eine geringfügige Akkumulation von PA28γ gegenüber der Kontrolle vorzuliegen. Da in anderen Experimenten keine Hinweise auf eine Induzierbarkeit des PA28γ-Proteins gefunden wurden (Abb. 13A) kann davon ausgegangen werden, daß IFN-γ weder die Expression noch die Stabilität von PA28γ beeinflusst.

Der spezifische Proteasominhibitor Lactazystin (LC) führt innerhalb der eingesetzten Periode von 4 Stunden zu keiner signifikanten Akkumulation von PA28γ. Da es sich bei dem Ki-Antigen jedoch um ein relativ langlebiges Protein handelt, ist bei der kurzen Inkubationsdauer mit LC nur ein geringfügiger Intensitätszuwachs der Ki-spezifischen Bande zu erwarten. Von längeren LC-Inkubationen wurde wegen zu erwartender massiver Schädigungen der Zelle abgesehen. Eine definitive Aussage, ob das 26S-Proteasom am Abbau von PA28γ beteiligt ist, kann daher nicht gemacht werden.

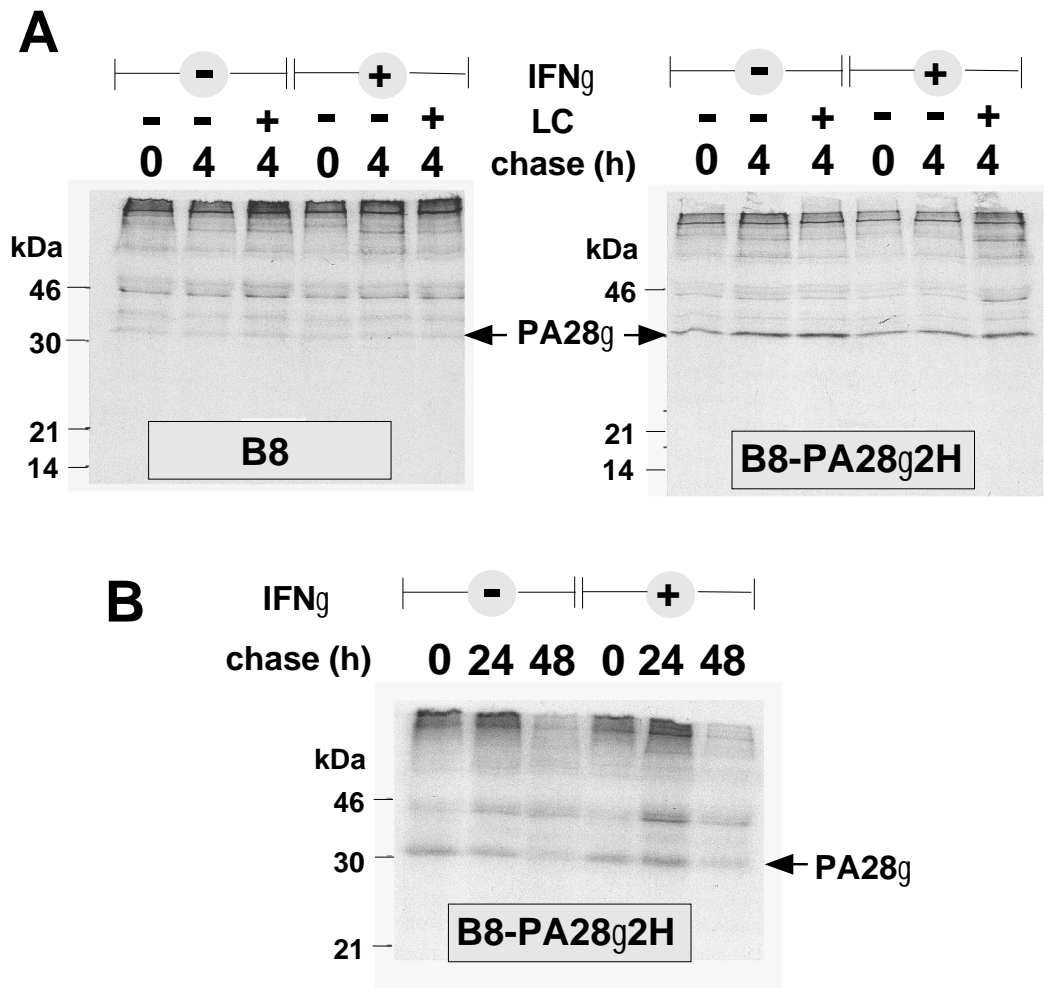


Abb. 16: Einfluß von IFN-g auf Expression und Stabilität von PA28g. Es wurden Immunpräzipitationsexperimente mit dem PA28g-spezifischen Kaninchenserum K#58.4 durchgeführt.

(A) Kurzzeitinkubation von B8-Fibroblasten und B8-PA28g-Transfektante mit 100 U/ml IFN-g während der pulse-(1h)- und der chase-(4h)-Periode. Lactazystin (LC) wurde als spezifischer Proteasominhibitor während des "chase" eingesetzt (10 µM). (B) Langzeitinkubation der B8-PA28g-Transfektante mit 100 U/ml IFN-g, beginnend 24 h vor dem "pulse" (1h). Ein entsprechendes Experiment wurde mit B8-Zellen nicht durchgeführt, da nach 24h Behandlung, im Immunoblot eine Induktion von PA28g nicht nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 13A). Daher erfaßt dieses Experiment ausschließlich den Einfluß von IFN-g auf die Stabilität von PA28g. Die Degradationsrate scheint in Gegenwart von IFN-g etwas reduziert zu sein. LC wurde in diesem Langzeitexperiment nicht eingesetzt, da eine massive Schädigung des Zellstoffwechsels unter diesen Bedingungen dokumentiert wurde. Aufgrund der relativen Stabilität des PA28g-Proteins (> 24 h - < 48h) kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die geringfügige Stabilisierung durch LC in (A) signifikant ist.

3.2.5. Interaktionspartner des PA28 γ -Proteins

Da der stimulierende Effekt des PA28 γ -Proteins auf verschiedene Peptidaseaktivitäten des Proteasoms *in vitro* nur marginal ist, wurden neben einer Funktion als Proteasomaktivator alternative Erklärungen für die verbesserte MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation in Betracht gezogen. Es ist vorstellbar, daß PA28 γ mit anderen Proteinen heteromere Komplexe bildet, die bessere Aktivatoreigenschaften besitzen als PA28 γ -Homomere. Es könnte auch sein, daß PA28 γ mit Inhibitoren des Proteasoms interagiert, diese sequestriert und damit indirekt eine verbesserte, Proteasom-vermittelte Epitopgenerierung bewirkt. Desweiteren wäre es möglich, daß PA28 γ die Assoziation des Proteasoms mit intrazellulären Proteolysezentren vermittelt oder die Translokation von Peptiden aus dem Proteasom ins ER verbessert. Die hier skizzierten Hypothesen erfordern Protein-Protein-Interaktionsstudien, um Bindungspartner dieser Proteine zu identifizieren. Mit Hilfe der "Yeast-Two-Hybrid"-Technik (YTH) und eines Filterbindungstests konnte ich erste Interaktionspartner des PA28 γ -Proteins *in vitro* identifizieren (Abb. 17). Im YTH-Ansatz wurde die Rekonstitution der transaktivierenden GAL4-Funktion über die Messung des β -Galaktosidasereportergens in Hefelysaten gemessen (Abb. 17A). Neben der homomeren PA28 γ -PA28 γ -Interaktion wurden auch Interaktionen mit den beiden anderen PA28-Proteinen nachgewiesen. Diese Interaktionen scheinen *in vivo* nicht relevant zu sein, da bisher durch biochemische Aufreinigung oder Immunpräzipitation eine solche Assoziation nicht bestätigt wurde. In der Tat konnte ich von den YTH-Interaktionen in Abb. 17A nur die PA28 α -PA28 β -Interaktion sowie die PA28 γ -PA28 γ -Interaktion in einem unabhängigen System, d.h. mit der FarWestern-Technologie bestätigen (Abb. 17B). Im Filterbindungstest interagierte ein weiteres Protein, der PI31-Inhibitor mit PA28 γ . Dieses Protein wurde als Inhibitor von Peptidaseaktivitäten des Proteasoms und als Kompetitor der 20S-PA28-Interaktion *in vitro* beschrieben (Chu-Ping et al. 1992; Zaiß et al., 1999). Sollte PA28 γ auch *in vivo* ein Bindungspartner von PI31 im Zellkern sein, so könnte die verbesserte Antigenpräsentation mit der Sequestrierung des Inhibitors erklärt werden.

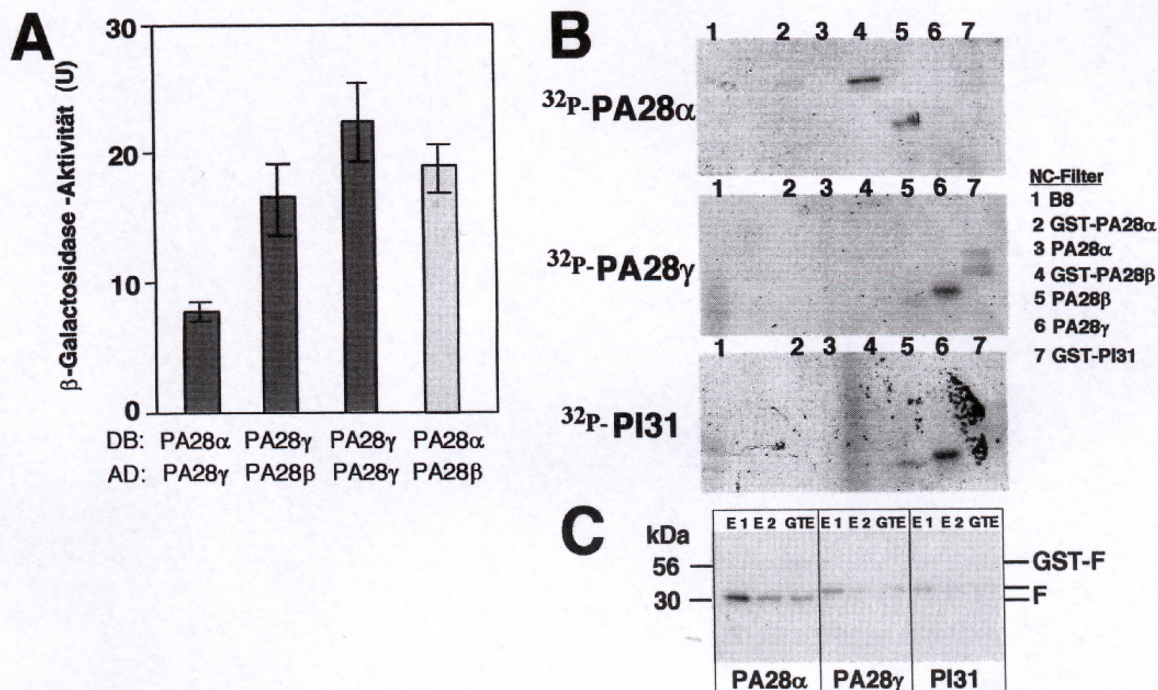


Abb. 17: Protein-Protein-Interaktionen (PPI) des PA28γ-Proteins. (A) β-Galaktosidase-Aktivitäten des LacZ-Reportergens im "Yeast-Two-Hybrid"-Flüssigassay. Es wurden Interaktionen von PA28γ mit PA28α und PA28β nachgewiesen. Die Interaktion des PA28γ-PA28γ-Homodimers im Hefenukleus entspricht in ihrer Stärke der von PA28α-PA28β-Dimeren (Kontrolle: hellgraue Säule). **(B)** Filterbindungstest auf PPI ("FarWestern"). RecPA28- und recPI31-Fusionsproteine (GST-F) wurden mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und Herzmuskelkinase radioaktiv markiert, durch limitierte Thrombinproteolyse von Glutathionsäulen eluiert und als $\gamma^{32}\text{P}$ -Interaktionsprobe auf filtergebundene Proteine eingesetzt. Potentielle Interaktionspartner (Proteine 1-7) wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose-(NC)-Filter transferiert. **(C)** Das Autoradiogramm (SDS-PAGE) belegt die Integrität der $\gamma^{32}\text{P}$ -Probenproteine in den verwendeten Eluaten (E1, E2). Eine 5. Elution mit Glutathionpuffer (GTE) belegt eine vollständige Thrombinprozessierung, da nur Spuren der Glutathion-S-Transferase-Proteine (GST-F) nachgewiesen wurden. Methodische Details in Abschnitt 5.4 (YTH-System) und 5.5 ("FarWestern").

3.3. Protein-Protein-Interaktionen proteasomaler Untereinheiten mit Proteinen des Proteasomaktivators PA28 und viralen Proteinen

3.3.1. Die Proteasomuntereinheit $\alpha 4$ /MC6 interagiert mit PA28a/b

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) ist ein partiell doppelsträngiges DNA-Virus, welches über den Polyalbuminrezeptor in die Hepatozyten aufgenommen wird. Neben akuten Infektionen kann es jedoch auch zu persistierenden HBV-Infektionen kommen, in deren Folge sich hepatuzelluläre Karzinome entwickeln. Die Translation von überlappenden offenen Leserastern des HBV Genoms führt zur Expression eines 24 kD Glykoproteins (Gen S; HBsAg-Oberflächenantigen), eines 21 kD Proteins (Gen C; HBcAg, Nukleokapsid-Antigen), der viralen Polymerase (Gen P) und des Genes X. Das 154 Aminosäuren umfassende HBx-Protein konnte in chronisch infizierter Leber und in hepatuzellulären Karzinomen nachgewiesen werden (Dandri et al., 1996). Unklar ist jedoch, wie dieses für die Virusreplikation überflüssige Genprodukt seine zahlreichen Wirkungen in Nukleus und Cytoplasma ausübt (Sirma et al., 1998).

Neuere Untersuchungen belegen, daß das HBx-Protein mit der C-terminalen Domäne der C6 Untereinheit des Proteasoms interagiert (Huang et al., 1996; Fischer et al., 1995). Das HBx-Protein wurde sowohl als Substrat (Halbwertszeit: 30 min) als auch Inhibitor des 26S-Proteasoms beschrieben (Hu et al., 1999).

Da das 20S-Proteasom und der PA28-Aktivator eine Schlüsselrolle in der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation einnehmen, interessierte mich die Frage, ob das HBx-Protein möglicherweise durch Bindung an die $\alpha 4$ /MC6-Untereinheit mit der Aktivierung durch den PA28-Komplex interferiert. Eine Einflußnahme des HBV auf die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation könnte eine Erklärung für den Ursprung von Tumorzellen sein, die der Immunüberwachung entgehen.

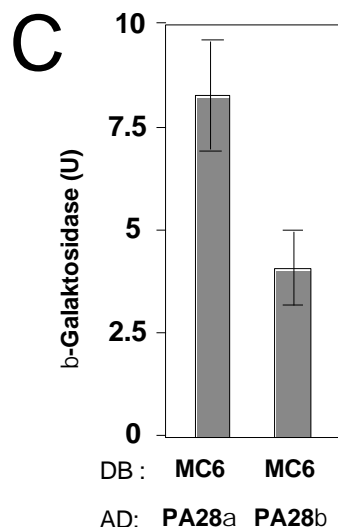
Da die Bindungspartner von PA28 α und PA28 β im 20S-Proteasom nicht bekannt sind, untersuchte ich zunächst, ob die MC6-I-Untereinheit (kurze Isoform; Ni et al., 1995) ein Bindungspartner von Regulatoruntereinheiten ist. Die MC6-I-Untereinheit wurde aus einer cDNA-Bank der Maus mittels PCR amplifiziert (Abb. 18A). Die MC6-I-cDNA wurde in die Shuttlevektoren pAS2-1 und pACT2 kloniert und in Hefen transfiziert. Nach Kotransfektion/Mating der PA28 α und PA28 β -Expressionskonstrukte wurde die Interaktion der Gal4-DB und Gal4-AD-Fusionsproteine zunächst im β -Galaktosidase Filterassay (Abb. 18B) und dann im semiquantitativen Flüssigassay gemessen (Abb. 18C). Neben der Interaktion von MC6-I mit PA28 α und PA28 β zeigen die Kontrollen eine stärkere Interaktion von PA28 α und PA28 β , eine schwächere Interaktion von PA28 α mit PA28 α (Abb. 18D). Da MC6 damit als Bindungspartner der PA28-UE, wie im übrigen auch als Bindungspartner von PA28 γ , oder von PA700-ATPse-UE (Daten nicht gezeigt) - identifiziert wurde, besteht die Möglichkeit, daß die Bindung des HBx-Proteins an MC6-I mit der Interaktion der beiden Aktivatoruntereinheiten PA28 α und PA28 β interferiert.

A MC6-I-cDNA und -Proteinsequenz

```

1 ATG AGC TAC GAC CGC GCC ATC ACC GTC TTC CCC GGC CAC CTC TTC CAA GTG GAG 60
1 M S Y D R A I T V F S P D G H L F Q V E 20
61 TAC CGC CAG GAG GCG GTC AAA AAG GGC TCC ACC GCG GTT GGT GTC CCA GGA AAG GAC ATT 120
21 Y A Q E A V K K G S T A V G V R G K D I 40
121 GTT GTT CTT GGT GTG GAA AAA TCA GTG GCC AAG CTA CAA GAT GAA AGA ACA GTA CGA 180
41 V V L G V E K K S V A K L Q D E R T V R 60
181 AAA ATC TGC GCC TTG GAC GAT AAC GTC TGT ATG GCC TTT GCA GGT CTC ACC GCC GAT GCA 240
61 K I C A L D D N V C M A F A G L T A D A 80
241 AGG ATA GTC ATC AAC AGA GGC CGG GTA GAG TGC CAG AGC CAC CGC CTA GCA GTG GAG GAC 300
81 R I V I N R A R V E C Q S H R L T V E D 100
301 CCA GTG ACT GTG GAG TAC ATC ACC CCG TAC ATT GCG AGT CTG AAG CAG CTT TAT ACA CAG 360
101 P V T V E Y I T R Y I A S L K Q R Y T Q 120
361 AGC AAT GGG CGC AGG CAA TTT GGT ATC TCG GCC CTA ATT GTG GGT TTT GAC TTT GAT GGC 420
121 S N G R R Q F G I S A L I V G F D F D G 140
421 ACT CCC AGA CTC TAT CAG ACT GAC GCC TCG GCC ACA TAC CAT GCT TGG AAG GCC AAT GCC 480
141 T P R L Y Q T D P S G T Y H A W K A N A 160
481 ATA GCG CGC GGC GCC AAG TCA GTG CTT GAA TTT CTG GAG AAG AAC TAC ACA GAT GAT GCC 540
161 I G R G A K S V R E F L E K N Y T D D A 180
541 ATT GAA ACA GAT GAT CTG ACC ATC AAA CTT GTG ATC AAG GCA CTG TTA GAG GTG GTC CAG 600
181 I E T D D L T I K L V I K A L L E V V Q 200
601 TCA GGT GGC AAA AAC ATC GAA CTT GCC GTC ATG AAG CGG GAT GAC CCC CTC AAG ATT CTA 660
201 S G G K N I E L A V M R R D Q P L K I L 220
661 AAT CCT GAA GAA ATT GAG AAG TAT GTT GCT GAA ATT GAG AAG GAG AAA GAA GAA AAT GAA 720
221 N P E E I E K Y V A E I E K E K E E N E 240
721 AAG AAG AAA CAA AAG AAA GCA TCA TGA 740
241 K K K Q K K A S *

```



B YTH-Konstrukte

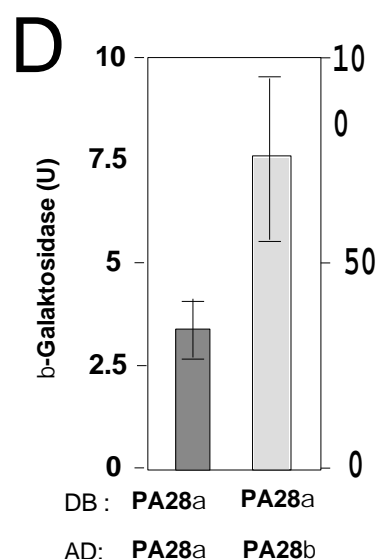
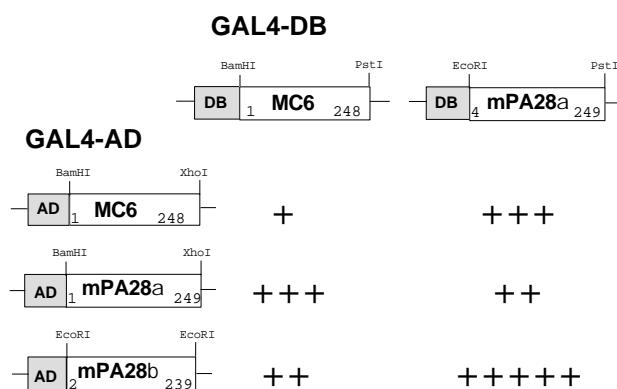


Abb. 18: Protein-Protein-Interaktionen der Proteasom-UE $\alpha 4$ /MC6-I mit PA28a und PA28b.

(A) Nukleotidsequenz der $\alpha 4$ /MC6-I cDNA. Die cDNA wurde mittels PCR aus einer cDNA-Bank amplifiziert, in YTH-Vektoren kloniert und sequenziert. Die deduzierte Aminosäuresequenz des MC6-I-Proteins ist zu 98% mit der humanen cDNA (XAPC7; Huang et al. 1996) oder der cDNA aus Ratte (Ni et al. 1995) identisch. Folgende Aminosäure-Substitutionen wurden gefunden: Maus-Mensch: K38R, E99G, Q126P; N221S; Maus-Ratte: K38R, Q126P; D179E, P216S. (B) YTH-Konstrukte und Übersicht über Ergebnisse des b-Galaktosidase-Filterassays. Die relative Interaktionsstärke (+) wurde entsprechend dem Zeitraum abgeschätzt, in dem eine Blaufärbung im Filterassay auftrat: +++++ = innerhalb von 60 min, +++ = 1- 5 h; ++ = 5-8h; + = schwache Interaktion 8- 24h. (C) Indirekte Quantifizierung der Interaktionsstärke über die Messung der Reportergenaktivität im Flüssigassay. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der in Hefelysaten gemessenen b-Galaktosidase-Aktivität von 3 Klonen an. (D) Zum Vergleich wurden die relativen Interaktionsstärken von PA28a-PA28a- und PA28a-PA28b-Interaktionen gemessen. Zu beachten sind die beiden unterschiedlichen Skalen für die homologe und die heterologe Interaktion.

3.3.2. YTH-Interaktionsscreening mit PA28a

In einer Antikörperbindungsstudie konnte die Proteasom-UE $\alpha 6/C2$ als Interaktionspartner des 11S-Regulators identifiziert werden. Wir konnten weder mit der GST-''pull down''-Technologie noch mittels eines YTH-Ansatzes weitere Interaktionen von PA28 α oder der PA28 γ (''bait''-Konstrukte) mit Proteasom-UE nachweisen. Daher ist davon auszugehen, daß die Interaktionen gewisser α -Proteasomuntereinheiten die Quartärstruktur interagierender Proteasom-UE benötigen, um mit ausreichender Affinität an Aktivator-UE zu binden. Eine Ausnahme stellte hierbei die $\alpha 4/MC6$ -UE dar, die zwar auch nicht während eines YTH-Screenings aus einer cDNA-Bank gefischt wurde, jedoch zumindest beim einfachen, paarweisen Testen im YTH-System als Interaktionspartner von PA28-UE identifiziert wurde. Die Schwierigkeiten PPIs von α -Proteasomuntereinheiten im ''yeast two-hybrid''-Screening von cDNA-Banken nachzuweisen, beruhen sicherlich auch auf konformationellen Interferenzen, die durch die Fusion der GAL4-AD an die Aminotermini der Proteasom-UE entstehen. Im YTH-Interaktionsscreening einer pACT-2-cDNA-Bank (''mouse brain MATCHMAKER cDNA library'' CLONTECH) mit einem pAS-2-1-PA28 α -Konstrukt wurden aus 5 Millionen unabhängiger, doppeltransformierter Hefeklonen 72 potentielle Interaktionspartner des PA28 α -Proteins identifiziert (Tabelle 3). Allerdings handelte es sich bei den interagierenden Domänen der GAL4-AD-Fusionsproteine um sehr kurze Peptidfragmente, die über Datenbankvergleiche keinem bekannten Protein zugeordnet werden konnten. Vielmehr resultierten diese Interaktionspeptide aus cDNA-Fusionen untranslatierter Leseraster, die nach wenigen Kodons von einem Stopkodon gefolgt wurden. Gemeinsame Sequenzeigenschaften einiger dieser Peptide sind in Tabelle 3 hervorgehoben. Das unerwartete und ungewöhnliche Ergebnis dieses Interaktionsscreenings deutet auf eine spezifische Peptidbindungsaktivität des PA28 α -Proteins hin. Andere PPIs wurden in diesem Interaktionsscreening nicht identifiziert. Möglicherweise sind die Affinitäten der im Interaktionsscreening selektionierten Peptide wesentlich stärker als die mit anderen potentiellen Interaktionspartnern. Um bekannte Bindungspartner wie z.B. die PA28 β -UE unter den Bedingungen des Interaktionsscreenings zu isolieren, müssen wahrscheinlich noch mehr unabhängige Klone analysiert werden, als dies in dem hier beschriebenen Experiment ohnehin schon der Fall war. Sollten die Hinweise auf Bindung spezifischer Peptide durch PA28 α durch andere methodische Ansätze bestätigt werden, so wäre dies im Hinblick auf Peptidtranslokationsfunktionen von PA28-Aktivatoren von Bedeutung. Hierbei sind nämlich Interaktionen der PA28-Proteine mit Peptiden zu postulieren, die die erleichterte Diffusion von Peptidsubstraten ins Innere des Proteasoms oder von Peptidprodukten aus dem Proteasom heraus, vermitteln. In diesem Sinne sind die Ergebnisse des YTH-Interaktionsscreenings ein stützender Befund des in Abschnitt 3.1.5 beschriebenen Translokationsmodells der Aktivierung.

Tabelle 3: YTH-Interaktionspeptide des PA28a-Proteins

Hefe-Klon Nr.	Länge in AS	Peptidfusionen der GAL4-AD, die mit GAL4-DB-PA28 α interagieren und im YTH-System eine Aktivierung des lacZ-Reportergens bewirken
5	11	RGRVDLLLEGR
7	8	RRTGLTD
8	18	KRHNVTLSIHKYILEKCF
12	23	CYLVFLLDIYLHFKCYPLSSFPL
14	5	FFQLV
16	3	VNH
18	2	LR
20	2	RG
22	4	LFWC
23	23	VDYSQPITKISEPSIYYSEPERE
24	12	GHLTTWLLWHV
25	12	GHLTTWLLWHV
26	15	QSLSSPPSQQTQLQW
27	6	AESARV
28	15	HIWVSFMMVCCRPFS
29	90	LIQSQRYWNPLSTIRSLSGNRGYCTKYCNSSRIR STRCTFRRGPNLQCYNCPCFRYNFLHSNTNNNWRLWKLT CTNNLSPRYSIPTNK
31	9	AKWRGVCLT
35	12	AGSSSCIPMFA
38	21	LNYSIAVKSPKVITYKRKCLI
39	14	QVWASKKTRCVVFV
41	4	VSHH
43	3	LVR
45	21	ANSIRASPMTGRTTWQSSSTSL
47	21	HSLPNISRTQNLRVHTTTKRP
49	4	HLSY
51	10	PSWQPKRRTR
53	8	IRQVICCT
54	24	MEGGLMDKPDNCPPEMLNLMRMCW
61	43	RVDFLGLLYAAGMRYFAKISLWAHCWRCVVVLYPHHHL LLHG
63	11	RVDKNSNQSSK
65	40	FEFRVAGGRRVVLELPGA CSADLR SVGRTPG CIRS RKWS Q
67	29	TTPRPHSNRHSLPNISRTQNLRVHTTTKR
68	14	LITTSWTHPRSET
69	11	KKTSFFGKSFD
70	43	LTGIVLSNSSLDIVLHDTYYVVAHFHYVLSMGAVFAIIAG FVA
71	15	QSLCSSPSSQQTQLQN

*Einige wiederkehrende Sequenzmotive wurden durch Unterstreichung, Fettdruck oder Farbe hervorgehoben.

Bei Peptiden mit Häufung der Aminosäure Cystein und Histidin ist zu prüfen, ob es sich bei den identifizierten Peptiden um falschpositive Interaktionspartner mit einem Zinkfingerkonsensusmotiv handelt (z.B. Klasse-I-Zinkfinger in TFIIIA: Y/FxC_{2,4}C₃F/Y₅L₂H_{3,4}H; Klasse-II-Zinkfinger in Steroidhormonrezeptoren: C₂C₁₃C₂C₁₄₋₁₅C₅C₉C₂C; Klasse-III-Zinkfinger in GAL4: C₂C₆C₅₋₆C₂C₆C). Falschpositive Hefeklone werden in Kontrollexperimenten ermittelt, indem die β -Galaktosidase-Aktivität in der Hefe nach einem Plasmid-„release“ gemessen wird. Beim Plasmid-„release“ wird auf Hefen selektioniert, die das DB-Plasmid verloren haben und daher negativ reagieren müssten, es sei denn, sie trügen ein Fusionsprotein, das die GAL4-AD-Domäne zum vollständigen Transkriptionsfaktor rekonstituiert. Die gezeigten Peptide sind vermutlich zu kurz um DB-Domänen nach dem Zinkfingerprinzip zu bilden.

3.3.3. Interferenz des HBx-Proteins des Hepatitis B Virus (HBV) mit der Aktivierung des 20S-Proteasoms durch recPA28

Eine mögliche Interferenz des HBx-Proteins mit der Interaktion von 20S-Proteasom und PA28 wurde in unserem Rekonstitutionsmodell der Aktivierung (vgl. Kapitel 3.1.3.2) untersucht. Da der interagierende Bereich des HBx-Proteins schon identifiziert worden war (Abb. 19A; Huang et al., 1996), konnten wir ein synthetisches Peptid (HBx-116-138 VFKDWEELGEEIRLKVFLGGCR) zu Kompetitionsstudien verwenden. Als Kontrollpeptide wurde ein Peptid gleicher Aminosäurezusammensetzung aber mit zufälliger Primärsequenz eingesetzt (Abb. 19).

In Kurzzeitverdaus mit dem 20S-Proteasom konnten mittels HPLC und Masseanalyse keine Degradationprodukte des HBx-116-138-Peptides nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, daß die beobachteten Effekte auf das vollständige Peptid zurückzuführen sind. Das 20S-Proteasom wurde mit dem HBx-Peptid vorinkubiert. Die Aktivierung durch PA28 α oder PA28 $\alpha\beta$ wurde in Gegenwart oder Abwesenheit von HBx-116-138- oder von Kontrollpeptid gemessen. Während in Gegenwart von HBx-Peptid eine deutliche Reduktion der Aktivierung zu beobachten war, blieb die Aktivierung in der Kontrolle erhalten. (Abb. 19B) In einigen Experimenten wurde ein stimulierender Einfluß der Kompetitorpeptide auf die Aktivität des 20S-Proteasoms beobachtet. Eine Aktivierung des latenten Proteasoms ist durch zahlreiche Faktoren (Polylysin, SDS etc) belegt.

Der inhibitorische Effekt des HBx-Peptides auf die Aktivierung des 20S-Proteasoms durch PA28 α und PA28 $\alpha\beta$ wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und in Gegenwart steigender Inhibitorkonzentrationen untersucht. (Abb. 19C). Die Interaktion zwischen 20S-Proteasom und PA28 α war durch geringere Konzentrationen inhibierbar, als die Interaktion mit dem PA28 $\alpha\beta$ Aktivator. Bei einer Substratkonzentration von 100 μ M Suc-LLVY-MCA wird eine halbmaximale Inhibierung der PA28 α -Aktivierung durch 10 μ M Hbx Peptid erreicht. Bei der gleichen Inhibitorkonzentration beträgt die Inhibierung der PA28 $\alpha\beta$ Aktivierung maximal 5 %. Erst bei 100 μ M HBx Peptid tritt ein signifikanter inhibitorischer Effekt auf die PA28 $\alpha\beta$ Aktivierung auf (Abb 19 C). Bisher ist noch unklar, ob es sich bei der beobachteten Inhibierung

aus kinetischer Sicht um eine Kompetition der Interaktion zwischen α -Proteasom-UE und PA28-Proteinen, oder um eine nicht-kompetitive Inhibition durch Bindung des HBx-Peptid an den PA28-Aktivator handelt. Die Geschwindigkeitsgleichung (3.1), die den gefitteten Kurvenverlauf in Abb. 19C beschreibt ist im Abschnitt 5.2.5 aufgeführt und erläutert.

Die Verifikation der Peptidinhibierungsexperimente durch Einsatz von recHBx-Protein ließen sich bisher nicht verwirklichen, da eine Renaturierung rekombinant exprimierten HBx-Proteins bisher nicht gelang.

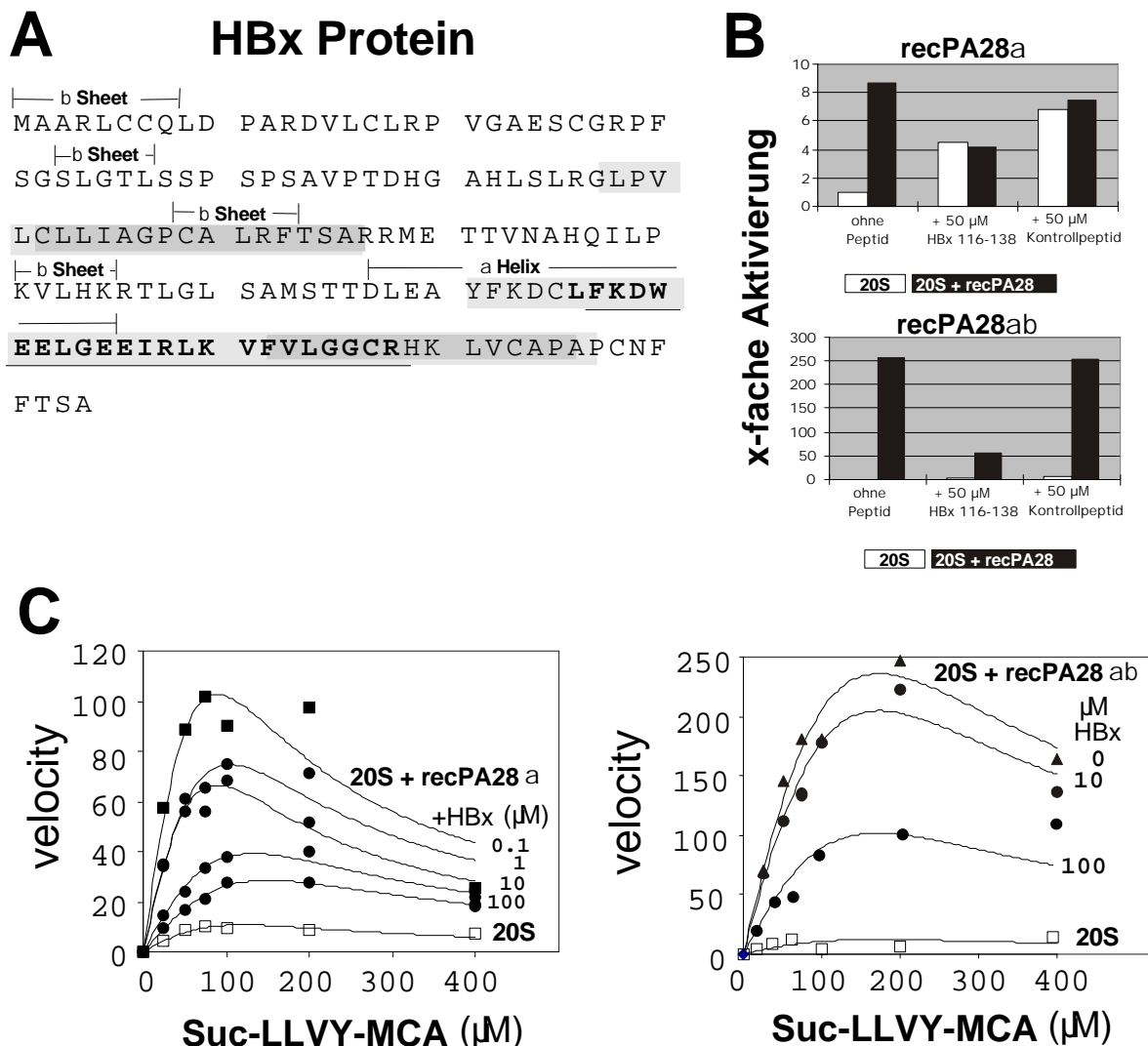


Abb. 19: Das HBx-Protein, ein Inhibitor der Proteasomaktivierung ? (A) Primärstruktur des HBx-Proteins. Einige Sekundärstrukturelemente wurden hervorgehoben. Die grau unterlegten Sequenzbereiche markieren eine putative Kunitz-Domäne (Proteaseinhibitor). Diese Sequenzbereiche sind auch für die Interaktion mit den H3/H4/H5-Helices (siehe Abb. 2) der Proteasom-UE $\alpha 4/\text{C}6$ essentiell (Huang et al. 1996). Da die Mutationen W120R, G136V und H139D besonders effektiv die *in vitro*-Interaktion mit der Proteasom-UE $\alpha 4/\text{C}6$ beeinträchtigen, wurde ein Peptid (HBx-116-138, Sequenz unterstrichen) aus dieser Region für Wettbewerbsversuche ausgewählt. Im synthetischen Kontrollpeptid wurden die Aminosäuren dieser Sequenz zufällig angeordnet (NH₂-CIRLEFEGWEFLEVGLKRGVDLK-CONH₂). (B) Inhibierung der recPA28a- oder recPA28ab-vermittelten Aktivierung des 20S-Proteasoms durch HBx-116-138. Das Kontrollpeptid beeinträchtigt die Aktivierung nicht. (C) Wettbewerbsexperiment mit variierender Substratkonzentration (Suc-LLVY-MCA). Gemessen wurde die spezifische Aktivität des Proteasoms ("velocity") als nmol MCA-Freisetzung pro min x mg 20S-Proteasom in Gegenwart von PA28a oder PA28ab bei verschiedenen HBx-Peptidkonzentrationen. Die Kurven basieren auf der Modellierung der experimentellen Daten gemäß dem in Abschnitt 5.2.4 erläuterten Bindungsmodell.

4.1. Modulation des 20S-Proteasoms durch IFN-g: Implikationen für die MHC -Klasse-I-Antigenpräsentation endogener Antigene

Der Nachweis einer direkten Beziehung zwischen MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation und der Prozessierung antigener Peptide durch das Proteasom (Rock et al., 1994) wurde u.a. unter Verwendung verschiedener Proteasominhibitoren geführt (Übersicht: Tabelle 4). Einige experimentelle Befunde deuten daraufhin, daß neben der proteasomalen Prozessierung von MHC-Klasse-I-restringierten Epitopen möglicherweise alternative Routen existieren (Luckey et al., 1998). Da die Bildung MHC-Klasse-I-restringierter Peptide durch Proteasominhibitoren nur partiell inhibiert wird, sind möglicherweise weitere Proteasen an der Prozessierung cytosolischer und nukleärer Antigene beteiligt (Anton et al., 1998; Geier et al., 1999).

Tabelle 4: Vergleich der Inhibitorkonstanten selektiver Proteasominhibitoren

Inhibitor	Peptidaseaktivitäten		
	CHTR	TRYP	PGPH
	Suc-LLVY-MCA	Bz-VGR-MCA	Z-LLEßNA
(1) N-Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norinal	$K_i = 5.7 \mu\text{M}$	$K_i = 50 \mu\text{M}$	$K_i = 205 \mu\text{M}$
(2) Lactazystin	$\text{IC}_{50} = 0.8 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$
(3) Peptidylvenylsulfon	$\text{IC}_{50} = 0.3 \mu\text{M}$		
(4) 4,5-Methoxy-1-indanonyl-Peptid	$\text{IC}_{50} = 0.2 \mu\text{M}$		
(5) Peptidyl- α -Ketoaldehyd	$K_i = 3.1 \text{ nM}$		
(6) Peptidyl-Boronsäure	$K_i = 0.62 \text{ nM}$		
(7) Ritonavir	$\text{IC}_{50} = 3.0 \mu\text{M}$		$\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{M}$

Die eingesetzten Konzentrationen betrugen jeweils 100 μM für das CHTR -und das PGPH-Substrat und 400 μM für das TRYP-Substrat. Die Inhibitor-Konstanten (K_i und IC_{50}) sind der Übersichtsarbeit von Groettrup & Schmidtke (1999) entnommen. Calpain I wird von (1) ebenfalls inhibiert ($K_i = 0.12 \mu\text{M}$). Andere Proteasen werden von (2) nicht inhibiert. (7) inhibiert die HIV-I-Protease ($K_i < 0.1 \text{ nM}$). Weitere Inhibitoren des Proteasoms mit anti-tumorigener Wirkung wurden kürzlich beschrieben (Adams et al., 1999).

Studien mit Inhibitoren des Proteasoms ließen auch Rückschlüsse auf die beteiligten Aktiven Zentren und den generellen Proteolysemechanismus zu (Groll et al., 1997). Der Peptidaldehydinhibitor LLnL bindet unter Bildung von Hemiacetalen an die Thr-1-Reste der drei konstitutiven "activ site"-UE $\beta 5/\text{MB1}$, $\beta 1/\text{Delta}$ und $\beta 2/\text{MC14}$ (Groll et al., 1997), nicht jedoch an die $\beta 7/\text{N3}$ -UE. Diese UE besitzt zwar ebenfalls ein aminoterminal Threonin-1, jedoch kein Lysin-33, welches eine Rolle als Protonendonator /-akzeptor im Katalysemechanismus einnimmt.

Wie der Austausch einzelner β -UE die Schnittpräferenzen und damit die Prozessierung von Peptidepitopen im Detail beeinflussen, ist hingegen nicht vollkommen verstanden. Es konnte gezeigt werden, daß für die Präsentation spezifischer MHC-Klasse-I-Antigene der Einbau einzelner Immuno-UE, wie z.B. LMP2 erforderlich ist. So wurde in der T-Lymphomalinie SP3 ein MHC-Klasse-I-Präsentationsdefekt mit Spezifität für ein Influenza-Antigen beschrieben, der auf einer Unterexpression von LMP2 basiert und durch Stimulierung der LMP2-Expression aufgehoben werden kann (Sibille et al., 1995).

Strukturbetrachtungen auf der Grundlage des 20S-Proteasoms der Hefe und Sequenzvergleiche mit den homologen Mammalia-UE zeigen für das Delta/LMP2-Paar eine Korrelation zwischen veränderter Peptidaseaktivität (PGPH \Downarrow und CHTR \Uparrow) und strukturellen Merkmalen. Die P1-Tasche der β 1/Delta-UE ist geeignet negativ geladene Reste aufzunehmen, während die P1-Tasche der i β 1/LMP2-UE bevorzugt hydrophobe Aminosäuren in P1-Position bindet. Für die beiden anderen Austauschpaare läßt sich ein solcher Präferenzwechsel auf struktureller Ebene nicht erklären (Groettrup und Schmidtke, 1999). Außerdem beeinflussen in längeren Peptiden neben der P1-Aminosäure weitere Aminosäurereste innerhalb wie auch außerhalb des Epitops die Prozessierungseffizienz ("flanking residue hypothesis", Shimbara et al., 1997; Del Val et al. 1991; Shimbara et al., 1998; Holzhütter et al., 1999; Yellen-Shaw & Eisenlohr, 1997).

Die Entdeckung einer reziproken Expression induzierbarer und konstitutiver β -UE in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben der Maus (Abschnitt 2.1.3) läßt Rückschlüsse auf gewebespezifische Funktionen des 20S-Proteasoms bei der Entwicklung der zellulären Immunantwort zu. Im Gegensatz zu den drei konstitutiven "active site"- Untereinheiten (β 1, β 2, β 5) und ihren reziprok exprimierten Austauschpartnern (i β 1, i β 2, i β 5) wurde für andere UE (z.B. α 2/MC3) eine homogene RNA-Verteilung in Geweben gefunden. Die unterschiedlichen RNA-Verteilungsmuster können als Summe einer Regulation der Transkriptionsraten und der mRNA-Stabilität interpretiert werden. Möglicherweise ist es für die Zelle vorteilhaft, die mRNA-Menge konstitutiver "active site"-UE zu reduzieren, um bei der Proteasomassemblierung eine Konkurrenz mit den Translationsprodukten der induzierbaren "active site"-UE zu minimieren.

Die reziproke Verteilung von konstitutiven Proteasomen und von Immunoproteasomen wird von uns im Hinblick auf die T-Lymphozyten Selektion im Thymus und die Etablierung der Toleranz potentiell autoreaktiver T-Zellen diskutiert [3]. Es ist die Aufgabe der MHC-Klasse-I restringierten Immunantwort viral infizierte Zellen aus verschiedenen Geweben zu eliminieren. Antigen-stimulierte Th1-Helferzellen sekretieren IFN- γ vorwiegend in räumlicher Nachbarschaft infizierter Zellen, die die *de novo* Synthese von Immunoproteasomen induzieren. Da Immunoproteasomen ein anderes Muster von MHC-Klasse-I-Liganden prozessieren, werden als Folge T-Zellen mit anderer Peptid/MHC-I-Spezifität stimuliert. Autoreaktive T-Zellen werden normalerweise während ihrer Entwicklung im Thymus erkannt und in der Regel durch negative Selektion beseitigt. Es ist daher entscheidend, daß im Thymus sowohl konstitutive als auch Immunoproteasomen exprimiert werden, um dem negativen

Selektionsmechanismus die Peptidspektren beider Proteasompopulationen zu präsentieren. Dieser Mechanismus könnte verhindern, daß T-Zellen mit Spezifität für Selbst-Peptide der negativen Selektion nach viraler Infektion und damit verbundener IFN- γ -Ausschüttung entgehen und Autoaggressivität entwickeln. Autoaggressive Zellen würden sich gegen Zellen wenden, die von Immunoproteasomen generierte Epitope präsentieren [3].

Die Beteiligung polymorpher Varianten von LMP2 an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ist ein Indiz für postulierte Funktionen der induzierbaren Proteasom-UE im Kontext von Autoimmunität und Selbst-Toleranz (Zhou et al., 1993; Juvenile rheumatoide Arthritis; Pryhuber et al., 1996; Spondylitis ankylopoetica, Morbus Bechterew; Maksymowych & Russel, 1994).

Die funktionellen Auswirkungen des MC14/MECL-1-Austauschs auf die Peptidaseaktivitäten des Mammalia-Proteasoms werden in einer neueren Studie deutlich. Mutierte MECL-1 Proteine, bei denen der aktive Threoninrest durch Alanin ersetzt wurde, werden ins 20S-Proteasom eingebaut, aber nicht korrekt prozessiert. Als Konsequenz wird MC14 zwar ersetzt, jedoch durch eine proteolytisch inaktive Proteasomuntereinheit. So wird durch den funktionellen "knock out" von MECL-1/MC14, die trypsin-ähnliche Aktivität des 20S-Proteasoms ausgeschaltet (Salzmann et al., 1999).

Der Einfluß der LMP7-UE auf katalytische Eigenschaften des Proteasoms wurde von mir an aufgereinigten Proteasomen aus Geweben von LMP7-"knock out"- und Wildtyp-Mäusen untersucht [5]. Diese Untersuchungen belegen einen Zusammenhang zwischen der $\beta 5/i\beta 5$ - (MB1/LMP7)-Expression und der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Proteasomen aus Thymus und Milz (Immunoproteasomen) in pp89-Peptid-Verdaus sehr ähnliche HPLC-Peptidprofile erzeugen und in der Lage sind, das immundominante H-2L^d-Nonamerepitop des pp89-Proteins zu erzeugen. Die LMP7^{-/-}-Proteasomen aus Milz und Thymus generierten vermehrt ein oktameres pp89-Peptid, welches durch einen Schnitt entsteht, der das immundominante Epitop zerstört. In Verdaus mit LMP7^{+/+}-Proteasomen wurden hingegen reduzierte Mengen des Oktamers gefunden, während ein 11-mer Vorläuferpeptid des Nonamers überwog [5]. Die unterschiedlichen Schnittpreferenzen von LMP7^{-/-}- und LMP7^{+/+}-Proteasomen korrelieren mit dem beobachteten Phänotyp einer verminderten Präsentation eines MHC-Klasse-I-restringierten Selbst-Peptides in LMP7-"knock out"-Mäusen (Fehling et al., 1994).

Einige Arbeiten aus der Bostoner Gruppe um A. L. Goldberg (Gazycinska et al., 1993; 1994; 1996) beschreiben ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Chymotrypsin-ähnlicher Aktivität und dem Einbau von LMP7 in das 20S-Proteasom. Allerdings wurde in diesen Arbeiten im Gegensatz zu Arbeiten aus unserem Labor (Boes et al., 1994; Kuckelkorn et al., 1995; Stohwasser et al., 1996) eine Aktivierung der chymotrypsin-ähnlichen Aktivität nach Einbau von LMP7 und eine Senkung von V_{\max} für hydrophobe und basische Schnittpreferenzen nach Überexpression von $\beta 5$ /MB1 beobachtet. Diese Peptidaseaktivitäten wurden in Zellfraktionen gemessen, die durch differentielle Zentrifugation angereicherte Proteasomensedimente und sicherlich auch andere Proteinfaktoren, wie Proteasomaktivatoren und Inhibitoren enthielten.

Unsere Befunde hingegen basieren auf isolierten, chromatographisch gereinigten 20S-Proteasomen, deren Qualität in 2D-Gelen überprüft wurde. Allerdings kann auch hier eine Kontamination mit anderen Proteinen ($\ll 5\%$) nicht ausgeschlossen werden. Sicherlich unterscheiden sich die Arbeiten aus beiden Laboren auch bezüglich der Schnelligkeit des Präparationsverfahrens und damit verbundener Einflüsse auf die Latenz der in Aktivitätsmessungen verwendeten Proteasompräparationen. Die Arbeiten der Bostoner Arbeitsgruppe sind in guter Übereinstimmung mit den zu postulierenden Schnittpräferenzen, wie sie für eine optimierte Prozessierung der hydrophoben MHC-Klasse-I-Ankerreste erforderlich sind (Rammensee, 1993.) Der Grund für die Diskrepanz zwischen den Beobachtungen beider Labore ist bisher unklar. In neueren kinetischen Untersuchungen (Abschnitt 3.1.3.2) mit Proteasomen aus uninduzierten B8-Zellen (niedrige Expressionslevel von Immunoproteasomen) und B27-Transfektanten [4] (vgl. Abb. 7A und 7B) fand ich mit konstitutiven B8-Proteasomen - unabhängig von der Gegenwart verschiedener Aktivatorproteine - ungefähr doppelt so hohe V_{\max} -Werte für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität wie mit Immunoproteasomen aus B27-Tripletransfektanten. Diese Befunde bestätigen die vergleichenden Beobachtungen, die an Gewebeproteasomen [5] aus LMP7^{+/+} und LMP7-Knockout-Mäusen und an humanen T2-LMP-Transfektanten (Kuckelkorn et al., 1995) gemacht wurden.

Die Funktion des Proteasoms bei der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation *in vivo* ist durch zahlreiche Beispiele belegt (Übersicht: Rock & Goldberg, 1999). Neuere Untersuchungen deuten an, daß die Hierarchie von T-Zell-Antworten, d.h. die Erkennung dominanter, subdominanter oder kryptischer Epitope über die Modulation der Proteasomzusammensetzung beeinflußt werden kann. So konnte gezeigt werden, daß in Abwesenheit von $\beta 5$ /LMP7 die Bildung subdominanter Epitope ausbleibt (Sewell et al., 1999). Sewell und Mitarbeiter (1999) wiesen nach, daß die LMP2- und LMP7-unabhängige Präsentation eines C-terminalen Epitops der HIV-1 Reversen Transkriptase (ILKEPVHGV; HLA A*201) durch den Proteasominhibitor Lactazystin vermindert wird. Hingegen bewirken sowohl Lactazystinbehandlung wie auch LMP7-Überexpression die Präsentation des N-terminalen Epitops (VIYQYMDL), welches unter normalen Bedingungen vom Proteasom zerstört wird. Diese Beobachtung impliziert, daß die Modulation der IFN- γ -induzierbaren UE während der akuten Phase einer Infektion die Effizienz verändert, mit der verschiedene Epitope prozessiert und präsentiert werden.

4.2. Mikroglia als antigenpräsentierende Zelle des ZNS

In der vorliegenden Arbeit (Abschnitt 2.1.5; Referenz [6]) wurde der Versuch unternommen über die Charakterisierung proteasomaler Komplexe aus primärer Mikroglia der Maus Rückschlüsse auf Funktionen innerhalb der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation zu ziehen. Daher wurde die Dynamik der Veränderungen des 20S- und des 26S-Proteasoms im Hinblick auf eine Modulation durch Faktoren wie IFN- γ und LPS in primärer Mikroglia untersucht und mit der Situation in der BV-2-Zelllinie verglichen.

4.2.1. Cytokin-Netzwerke kontrollieren Mikrogliafunktionen

Die Kommunikation zwischen Neuronen, Astrozyten, Mikrogliazellen und T-Zellen wird durch ein Netzwerk von Cytokinen organisiert (Reviews: Gehrman et al., 1995). Die Cytokin-vermittelte interzelluläre Kommunikation im ZNS wird in Folge neuropathologischer Prozesse verändert (Aschner 1998).

Mikrogliazellen können *in vitro* wie *in vivo* in sekretorische aktive Phagozyten transformiert werden. Die Cytokin-/LPS-induzierte Transformation in Zellkultur dient als Modell für Vorgänge, wie sie im Gehirn nach Trauma oder Infektion beobachtet werden (Draheim et al. 1999). Wir konnten zeigen, daß sowohl IFN- γ - wie auch LPS-stimulierte Mikroglia TNF α , IL-6 und das Chemokin KC (GRO α) freisetzt. Derart aktivierte Mikroglia läßt sich auch elektrophysiologisch von unstimulierter Mikroglia anhand der Expression typischer Ionenkanalprofile unterscheiden (Kettenmann et al., 1993; Draheim et al., 1999).

4.2.2. LPS und IFN- γ induzieren die Expression von Immunoproteasomen

Die Untereinheitenkomposition des 20S-Proteasoms wurde zwar in Makrophagen-Zelllinien (Aki et al., 1994; Brown et al., 1993; Nandi et al., 1997), bisher jedoch nicht in primären Mikrogliazellen aus dem Cortex der Maus untersucht. Diese Lücke wird mit der vorliegenden Arbeit geschlossen [6].

Wir wiesen in unbehandelten Kulturen primärer Mikroglia aus dem Cortex neonataler Mäuse und in BV-2-Zellen (Boccini et al., 1992) alle 14 konstitutiven Proteasom-UE nach. Immunoproteasom-UE werden in uninduzierten Zellen nur in marginalen Mengen exprimiert (β 5/LMP7; β 1/LMP2) oder sind nicht nachweisbar (β 2/MECL-1). Sowohl IFN- γ wie auch LPS induzieren den Einbau der induzierbaren "active site"-UE in das mikrogliale Proteasom.

Betrachtet man die Expression von Immunoproteasomen als Marker für die immunologische Kompetenz der aktivierten Mikroglia, so kommt man zu dem Schluß, daß Mikroglia Epitope für CD8⁺-T-Lymphozyten präsentieren können sollte.

Neben Einflüssen auf die Zusammensetzung des 20S-Proteasoms konnten wir auch eine Veränderung des Musters PA700-assoziiierter Proteine feststellen. Die Dynamik dieses Proteasomregulators dürfte mit Signaltransduktionsprozessen in Zusammenhang stehen, die proteolytische Prozesse in die intrazelluläre Kommunikation mit einbeziehen. Zu diesem Resümee kommt auch eine neuere Studie, die zeigt, daß die LPS-induzierte Freisetzung von TNF α in Mikroglia durch Lactazystin inhibiert werden kann (Fine et al. 1999). Auch ist schon länger bekannt, daß das 26S-Proteasom maßgeblich an verschiedenen Schritten von NF κ B-vermittelten Signaltransduktionskaskaden beteiligt ist (Lin et al., 1998).

4.2.3. Die Mikroglia und ihre Rolle bei viralen und bakteriellen Infektionen

Virale und bakterielle Infektionen richten im ZNS aufgrund ihres Tropismus für bestimmte Zelltypen der Glia oder von Neuronen zumeist großen Schaden an. Daher muß die Verbreitung dieser Pathogene durch Abwehrmechanismen verhindert werden. Die Mikroglia gilt hierbei als potentielle antigenpräsentierende Zelle, die Pathogene phagozytieren kann und als professionelle APC Antigene im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert. Die Mikroglia kann jedoch auch selbst Ziel von viralen und bakteriellen Infektionen sein. Ihrer Funktion als MHC-Klasse-I-präsentierender Zelle wurde bisher wenig Aufmerksamkeit geschenkt (Frei et al. 1987; Perry, 1998). Der besondere Wirkungskreis der Mikroglia im ZNS erfordert besondere Regulationsmechanismen der Aktivität dieser hochspezialisierten Zelle. Überschießende Abwehraktivitäten der Mikroglia können ebenso schädlich sein wie unkontrollierte Infektionen, da von Mikroglia ausgeschüttete Mediatoren des Radikalstoffwechsels andere Zellen im Nervensystem schädigen können.

Das Proteasom ist ein wesentlicher Bestandteil der Antigenprozessierungsmaschinerie der Mikroglia. Wir zeigten, daß das 20S-Proteasom wie auch in anderen zellulären Systemen auf IFN- γ -Induktion mit struktureller Plastizität reagiert. Mit der Expression von Immunoproteasomen besitzt die aktivierte Mikroglia das Potential im Falle von Infektionen intrazellulär exprimierte virale Antigene zu prozessieren und im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche zu präsentieren. Nach Induktion mit IFN- γ sind weitere wichtige Voraussetzungen wie die Expression von MHC-Klasse I- und von kostimulatorischen Molekülen ebenfalls gegeben. Im Rahmen von Inflammationsreaktionen werden im ZNS vermehrt durch die Blut-Hirnschranke eingewanderte CD8⁺-T-Lymphozyten beobachtet, so daß antigen-spezifische T-Zell-Mikroglia-Interaktionen als wahrscheinlich gelten (Gehrmann et al. 1995).

Innerhalb des HIV-Dementia-Komplexes sind Mikrogliazellen für einige HIV-Stämme das Hauptreservoir viraler Proliferation im ZNS (Kolson et al., 1998). So proliferiert z.B. der makrophagotrophe HIV-Stamm SF128A, nicht jedoch der lymphotrophe HIV-Stamm SF2 in Mikroglia (McCarthy et al., 1998). Faktoren, die die Proliferation in dem einen Stamm fördern und in einem anderen Stamm restringieren, sind bisher nicht verstanden. Mechanismen, die die Hierarchie von T-Zell-Antworten regulieren, wie zum Beispiel die von verschiedenen Proteasompopulationen unterschiedlich prozessierten Peptidprofile von Zellen, sind in Betracht zu ziehen (Sewell et al., 1999). Im Zuge zahlreicher inflammatorischer und neurodegenerativer Erkrankungen des ZNS wurden sowohl CD4- als auch CD8+-T-Zellen im ZNS nachgewiesen.

Erstmals konnten wir in einem zellulären System eine Induktion von Immunoproteasomen durch Lipopolysaccharid beobachten. LPS ist eine Glykolipidkomponente der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Ein Serumfaktor, das LPS-bindende Protein, vermittelt die Interaktion zwischen dem LPS und seinem Rezeptor auf monomyeloischen Zellen und Endothelzellen (Wright et al., 1990). Die Rezeptor-Ligandeninteraktion stimuliert die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen und hat die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie TNF α , IL-6 und IL-8 zur

Folge. Intraperitoneale Interaktionen von LPS führen in Ratten zur Induktion der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-II- und -I-Molekülen auf 10% der amöboiden Mikroglia im supraventrikulären Corpus Callosum. Dies wird als Hinweis gewertet, daß diese Zellen möglicherweise sowohl mit CD4-Helferzellen als auch mit cytotoxischen CD8⁺-T Lymphozyten interagieren können (Xu & Ling, 1994).

Da LPS als bakterieller Stimulus monozytischer Zellen agiert, war die Beobachtung einer Modulation der Protease, die mit der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation in Verbindung steht, zunächst überraschend. Da jedoch exogene Antigene im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden können (Reiman & Kaufmann, 1997; Zwickey & Potter, 1999), interpretieren wir dieses Ergebnis als Ausdruck des "crosstalks" zwischen den klassischen Antigenpräsentationswegen (vgl. Abb. 3; Kovacsovics-Bankowski & Rock, 1994).

Neuere Untersuchungen belegen, daß das Proteasom unter bestimmten Umständen Substrate des klassischen endozytotischen Weges sowie luminal ER-Proteine degradieren kann (Plempner & Wolf, 1998; Hiller et al., 1996). Hierzu gehören Membranproteine, die wie z.B. MHC-Klasse-I-Moleküle unter Beteiligung des cytosolischen Proteasoms und ER-ständiger E2-Enzyme (Biederer et al., 1997) abgebaut werden können. Bakterielle Antigene, die von Pathogenen sekretiert werden, die im endolysosomalen Kompartiment persistieren oder ins Cytosol ausbrechen, unterliegen ebenso einer cytosolischen Degradation (Zwickey und Potter, 1999). Daher erscheint es uns plausibel, daß auch bakterielle Komponenten auf die Epitopprozessierung durch das Proteasom Einfluß nehmen können.

4.3. Die PA28-Proteinfamilie und ihre Rolle in der MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung

Die PA28-Proteinfamilie umfaßt drei Mitglieder, deren Phylogenie unterschiedliche Funktionen andeutet. Die beiden IFN- γ -induzierbaren UE des 11S-Regulators, PA28 α und PA28 β sind in Spezies vertreten, die einen MHC-Klasse-I-Präsentationsweg aufweisen. Die PA28 γ -UE wird hingegen auch in Organismen gefunden, die nicht über einen MHC-Klasse-I-restringierten zellulären Mechanismus der Immunantwort verfügen. Daraus wurde abgeleitet, daß PA28 γ andere - von der Immunantwort unabhängige Funktionen haben müsse (Groettrup & Schmidtke, 1999).

Dennoch weisen unsere Ergebnisse auf eine Wechselwirkung des PA28 γ -Proteins mit der Präsentation des immundominanten pp89-Epitops hin. Außerdem konnten wir Befunde anderer Arbeitsgruppen zur Stabilität und zum Einfluß von IFN- γ auf die Stabilität des ki-Antigens nicht bestätigen. Die zahlreichen Diskrepanzen zwischen unseren Ergebnissen und publizierten Daten legen nahe, daß das PA28 γ -Protein sich in unterschiedlichen zellulären Systemen unterschiedlich verhält. So wurde z.B. ein Einfluß der Zellproliferation auf die PA28 γ -Expression beobachtet (Nikaido et al., 1989). Auch wurden unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen für dieses Protein im Nukleus (Soza et al., 1997) und im Cytosol (Wojcik, 1999) beschrieben.

In "pulse chase"-Experimenten fanden wir keine Hinweise auf eine IFN- γ -induzierte Expression oder Degradation des PA28 γ -Proteins. Da die Halbwertszeit in der Größenordnung von >24 Stunden liegt, konnte eine weitere Stabilisierung des PA28 γ -Proteins durch Lactazystin experimentell nicht belegt werden.

Eine Überexpression von PA28 γ in unserem B8-Antigenpräsentationsmodell ergab eine epitopspezifische Stimulierung der CTL-Antwort. Dieser Befund war überraschend, da in vitro nur eine geringe stimulatorische Wirkung von PA28 γ auf Peptidaseaktivitäten des Proteasoms gefunden wurde. Der Nachweis einer Interaktion von PA28 γ mit dem Proteasominhibitor pI31 kann dahingehend interpretiert werden, daß PA28 γ inhibitorische Faktoren des Proteasoms möglicherweise sequestriert und so indirekt zu einer Stimulierung der Antigenpräsentation führt. Eine alternative Interpretation wäre eine Translokation oder Diffusion des Proteasoms zu Orten vermehrter Proteindegredation (Reits et al., 1997). Hierbei könnte PA28 γ die Interaktion des 20S-Proteasoms mit nukleären Proteolysezentren vermitteln. Allerdings wurde in unseren Experimenten kein Einfluß der Überexpression von PA28 γ auf die Stabilität des pp89-Proteins gefunden. Neuere Studien zum Abbau mutierter Nukleokapsidproteine des Influenzavirus deuten an, daß das Proteasom seine Degradationsaufgaben im Zellkern an spezifischen Proteolysezentren, den PODs (eng.: promyelocytic leukemia oncogenic domains) erfüllt (Antón et al., 1999).

Ein weiterer Aspekt möglicher Funktionen von Proteinen der PA28-Familie, die Regulation der RNase-Aktivität des Proteasoms, wurde bisher experimentell vernachlässigt. Wie die große Zahl aktueller Publikationen zeigt, wird diesem Gebiet in Zukunft größere Beachtung geschenkt werden: Dem Proteasom wurden neben den klassischen Funktionen als Protease auch RNase-Aktivitäten zugeschrieben (Horsch et al., 1989; Homma et al., 1994; Horikoshi et al., 1998). Eine proteasomale Untereinheit (α 5/Zeta), die auch als freies Monomer nachgewiesen wurde, besitzt Ribonuklease-Aktivität (Petit et al., 1997; Jorgenson & Hendil, 1999). Diese Untereinheit befindet sich in direkter Nachbarschaft zu der Untereinheit (α 4/C6), die ich als Bindungspartner von PA28 α , PA28 β und PA28 γ identifizieren konnte. Konformationelle Einflüsse der Bindung von PA28-Proteinen auf die Ribonuklease-Aktivität des Proteasoms sind vorstellbar.

Das Proteasom-Ubiquitin-System ist am Abbau des AUF-1-Proteins beteiligt. Dieses Protein bindet an AU-reiche Elemente in mRNAs und determiniert so deren Stabilität (Laroia et al., 1999). Die AU-Degradationssignale werden u.a. in Cytokin- und Protoonkogen-mRNAs gefunden. Kürzlich konnte der Nachweis geführt werden, daß die Anzahl von AUUUA-Motiven in mRNAs die Degradation durch die Endonukleaseaktivität des Proteasoms bestimmt (Jarrousse et al., 1999a). Der Abbau viraler RNAs durch die RNase-Aktivität des 20S-Proteasoms ist ebenfalls belegt (Jarrousse et al., 1999b).

4.4. Mechanistische und kinetische Aspekte der Proteasomaktivierung

Frühere Untersuchungen zur allosterischen Aktivierung des 20S-Proteasoms durch den 11S-Regulator PA28 sowie rekombinanter Untereinheiten ($\text{REG}\alpha$, $\text{REG}\beta$, $\text{REG}\gamma$, $\text{REG}\alpha\beta$) implizierten ein mechanistisches Modell, gemäß dem konformationelle Effekte auf die sechs aktiven Zentren des Proteasoms zur 20-40-fachen Steigerung des V_{max} -Wertes bei gleichzeitiger Konstanz des K_{m} -Wertes führten (Realini et al., 1997). Außer der hier vorgestellten Arbeit ist dies die einzige Untersuchung, die eine alleinige aktivierende Wirkung von PA28 β ($\text{REG}\beta$) belegt. Bezüglich der stimulierenden Eigenschaften des PA28 γ -Proteins stimmen meine Daten mit denen von Realini et al. (1997) überein: Wir finden eine signifikante Stimulierung der TRYP-Aktivität und jeweils nur geringe Effekte auf die CYTP- und die PGPH-Aktivität.

Aus mechanistischer Sicht interpretieren wir die PA28-vermittelte Proteasomaktivierung, wie sie durch die Modellgleichung (2.1) beschrieben wird, nicht auf der Basis von Veränderungen an den aktiven Zentren, sondern als erleichterten, PA28-Carrier-vermittelten Diffusionsprozeß von Substraten und /oder Produkten. Alle drei Typen von Aktivatorkomplexen - $\text{recPA28}\alpha$, $\text{recPA28}\beta$ und $\text{recPA28}\alpha\beta$ - können demnach allosterische Effektoren der Substratbindung sein, die die maximale Aktivität (V_{max}) des Substratumsatzes nicht verändern. Alternative mechanistische Interpretationen sind denkbar, jedoch weniger wahrscheinlich. Da die Aktivatorkomplexe nicht direkt mit den katalytisch aktiven UE des Proteasoms interagieren, könnte die selektive, allosterische Verbesserung der Substratbindung auch auf eine globale Konformationsänderung des Proteasoms zurückgeführt werden, die simultan die Bindungsregionen verschiedener Aktiver Zentren beeinflusst. Auch bei dieser alternativen Sichtweise würden nur die Affinitäten der Aktiven Zentren, nicht jedoch die V_{max} -Werte betroffen sein. Dennoch favorisieren wir ein Modell der beschleunigten Substrataufnahme durch verbesserte Bindung an die Proteasomöffnung und eine Transportkatalyse der Substrate ins Innere bzw. der Produkte aus dem Proteasom heraus. _Folgende Argumente stützen das Peptid-Translokationsmodell der Proteasomaktivierung:

1. Der hohe Index positiver Kooperativität ($n > 5$) legt die Existenz mehrerer Substratbindungsstellen nahe. Potentielle Kandidaten für solche Bindungsstellen wären die aminoterminalen H0-Helices der 7 α -UE des 20S-Proteasoms (siehe Abb. 2C), die in die Öffnung des Proteasoms hineinragen und den Substrateintritt unter Latenzbedingungen erschweren. Im Bereich niedriger Substratkonzentrationen stimulieren steigende Substratkonzentrationen den Substrateintritt und damit die Aktivität des 20S-Proteasoms. Im Bereich hoher Substratkonzentrationen führt die simultane Bindung von Peptidsubstraten zu einer Behinderung des Substrateintritts, d.h. zu einer negativen Kooperativität. Daher wird im Experiment ein inhibitorischer Effekt des Substrates beobachtet.

_2.) Die Tatsache, daß der Aktivatorkomplex die maximale Aktivität der Peptidhydrolyse nicht beeinflusst, spricht für die allosterische Regulation eines einzelnen Prozesses wie Substrataufnahme oder Produktfreisetzung, der die Hydrolysekinetik aller Substrate gleichermaßen beeinflusst. Das

Gegenmodell wäre eine globale Konformationsänderung, die die sechs Aktiven Zentren so stimuliert, daß die maximalen Aktivitäten strukturell verschiedener aktiver Zentren nicht betroffen sind.

In einer neueren Arbeit wird ein alternatives Modell zur Erklärung kooperativer Effekte bei der Aktivierung des 20S-Proteasoms vorgeschlagen (Kisselev et al. 1999). Wechselseitige allosterische Interaktionen zwischen verschiedenen Aktiven Zentren sollen für die beobachteten Kooperativitätseffekte der Proteasomaktivität verantwortlich sein. Die Caspase-ähnliche Aktivität wurde in den beschriebenen Experimenten durch Substrate der CHTR-Aktivität allosterisch stimuliert. Umgekehrt wurde eine allosterische Inhibierung der Chymotrypin-ähnlichen Aktivität durch Substrate mit Spezifität für die Caspase-ähnliche Aktivität gefunden. Für die Trypsin-ähnlichen Aktiven Zentren wurden keine kooperativen Interaktionen gemessen (Kisselev et al. 1999).

Realini et al., (1997) postulierten, daß das KEKE-Motiv der PA28 α -UE und ein ähnliches Motiv in den Proteasom-UE α 4/C6 und α 3/C9 miteinander interagieren und dies zu einer Stimulierung der Suc-LLVY-MCA und der ZLLE- β NA Hydrolyse führt. Die Aufklärung der Kristallstruktur des PA28 α -Heptamers (Knowlton et al. 1997) widerlegte diese Hypothese, da der entsprechende Sequenzabschnitt des KEKE-Motivs (Aminosäurepos. 70-91) in einer unstrukturierten Schleife am oberen Eingang des PA28 α -Aktivators liegt und daher nicht in direkte Interaktionen mit dem Proteasom involviert sein kann (Abschnitt 3.1.8, Abb. 12 und Zhang et al., 1998c). Meine "yeast two-hybrid"-Studien belegten, daß PA28 α D70-91 sowohl mit PA28 β als auch mit PA28 α interagieren kann. Das chromatographisch gereinigte PA28 α D70-91-Protein aktiviert alle drei Peptidaseaktivitäten des Proteasoms. Allerdings ergaben sich quantitative Unterschiede im Vergleich zum nicht-deletierten PA28 α -Aktivator bezüglich einzelner Peptidsubstrate. So weist die KEKE-Deletionsmutation eine 2-3x erhöhte Aktivierung der geladenen Substrate (Z-LLE- β NA, Bz-VGR-MCA) gegenüber dem Wildtyp-Aktivator auf. Hinsichtlich des hydrophoben Suc-LLVY-MCA Substrates ist die Aktivierung durch das Deletionskonstrukt um ca 40% niedriger als die Aktivierung mit authentischem PA28 α . Diese Befunde stützen unser Translokationsmodell. Möglicherweise werden gewisse Peptidsubstrate in Gegenwart der zahlreichen positiven wie negativen Ladungen tragenden KEKE-Motivs schlechter zu den Aktiven Zentren des Proteasoms transportiert, da die elektrostatischen Interaktionen mit der KEKE-Domäne den Eintritt in den oberen Bereich des Aktivator隧nells behindert. Diese Hypothese ist durch eine kinetische Analyse weiterer Mutanten überprüfbar, da Substitutionen des KEKE-Motivs im Schleifenbereich AS64-102 vermutlich gut toleriert werden. Aufgrund der Strukturdaten ist es unwahrscheinlich, daß globale Konformationsänderungen am PA28 α -Heptamer durch die Deletion der Aminosäuren 70-91 hervorgerufen werden und bis zu den Aktiven Zentren des Proteasoms weitergeleitet werden.

4.5. Interferenz viraler Proteine mit der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation

Eine direkte Anwendung unseres Aktivierungsmodells bestand darin, virale Faktoren zu untersuchen, die mit der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation auf der Ebene der Proteasomaktivierung interferieren. Virale Persistenzmechanismen können die Prozessierung von Antigenen, den Transport antigener Peptide ins ER oder die direkte Regulation der Oberflächenexpression von Molekülen wie CD4 oder MHC-Klasse-I-Molekülen beeinflussen (Ehrlich et al., 1995; DelVal et al. 1989; Ahn et al. 1996b; Ahn et al. 1997). So konnte für das HIV-tat-Protein gezeigt werden, daß es mit der Bindung des PA28-Regulators an das 20S-Proteasom kompetitiert. Hier wird ein Einfluß auf die Präsentation HIV-spezifischer Epitope vermutet (Seeger et al., 1997). Das HIV-vpu-Protein hingegen bewirkt eine Degradation von naszierenden CD4-Proteinen, den Korezeptoren der MHC-Klasse-II-Moleküle (Fujita et al., 1997; Schubert et al. 1998).

In "yeast two-hybrid"-Studien konnte ich nachweisen, daß die $\alpha 4/C6$ -UE eine Bindungsstelle für den PA28-Aktivator darstellt. Sowohl PA28 α als auch PA28 β interagierten im Hefe-Nukleus mit der $\alpha 4/C6$ -UE. Da das HBx-Protein ebenfalls an die carboxyterminale Region von $\alpha 4/C6$ bindet (Aminosäure-Nr. 137-248; Huang et al., 1996; 168-248, Fischer et al., 1995), lag es nahe, eine Interferenz des HBx-Proteins mit der Aktivierung des Proteasoms anzunehmen. Die Expression und Aufreinigung nativen HBx-Proteins sowie die Synthese längerer HBx-Peptide erwies sich aufgrund von Löslichkeitsproblemen als problematisch ("inclusion bodies"). Daher wurde die Interferenzhypothese mittels eines kurzen synthetischen HBx-Peptides getestet. Das HBx-Peptid 116-138 liegt im α -helicalen Bereich einer putativen Kunitz-Domäne, deren Beteiligung an der Interaktion mit dem 20S-Proteasom in Mutagenesestudien gezeigt worden war (Huang et al. 1996). Das 23-mer Peptid erwies sich in Inkubationsansätzen mit 20S-Proteasom und PA28-Aktivatorproteinen als stabil, d.h. es wurden keine signifikanten Mengen von Degradationsprodukten detektiert. Ich konnte zeigen, daß das HBx-Peptid - nicht jedoch ein Peptid gleicher Aminosäurezusammensetzung, aber mit unterschiedlicher Primärstruktur - die Aktivierung des 20S-Proteasoms durch PA28 α und PA28 $\alpha\beta$ konzentrationsabhängig inhibiert. Wie inzwischen von einer andern Gruppe gezeigt wurde, kann das HBx-Protein sowohl Substrat als auch Inhibitor des 26S-Proteasoms sein (Hu et al., 1999). Die genannte Arbeit, wie auch unsere Kompetitionsstudien, haben Implikationen für das Verständnis der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation. Möglicherweise verhindert das HBx-Protein die Präsentation HBV-spezifischer Antigene und damit die Erkennung und Eliminierung hepatozellulärer Tumorzellen. Eine T-Zellantwort gegen Epitope des Nukleokapsidproteins und der Oberflächenproteine wurden im Verlauf akuter HBV-Infektionen im Kontext der humanen MHC-Klasse-I-Moleküle HLA-A31, HLA-Aw68 und HLA-A2 beobachtet (Missale et al., 1993; Nayersina et al., 1993; Penna et al., 1991; Guidotti et al., 1994). Durch Applikation synthetischer HBx-Peptide konnte Chung et al. (1999) die Induktion HBx-spezifischer CTLs induzieren und damit Kandidaten für *in vivo*-Epitope des HBx-Proteins identifizieren.

4.6. Schlußfolgerungen und Perspektiven

Die Hypothese eines "Immunescape"-Mechanismus des Hepatitis-B-Virus kann in einem Antigenpräsentationsmodell -wie wir es zur Funktionsanalyse der Proteine der PA28-Familie verwendet haben - nach Überexpression des HBx-Proteins getestet werden. Von mir etablierte HBx-B8-Transfektanten werden derzeit bezüglich ihrer Expressionlevel, der MHC-Klasse-I Oberflächenexpression und einer möglicherweise inhibierten Prozessierung des immundominanten pp89-Epitops analysiert. Diese Analysen sollten in Zukunft auch HBV-spezifische Epitope umfassen. Mit der in-vitro-Rekonstitution der Proteasomaktivierung durch PA28 haben wir ein Testsystem etabliert, das es erlaubt, Einflüsse viraler Proteine auf das proteasomale System in vitro zu untersuchen. In Kombination mit Protein-Protein-Interaktionsstudien können somit in Zukunft gezielt virale Interaktionspartner des Proteasoms identifiziert und virale Persistenz- mechanismen untersucht werden, die auf der Modulation der Proteasomaktivitäten durch virale Proteine basieren. Die nach diesem Screeningschema identifizierten Proteine werden dann in vivo in geeigneten Antigenpräsentationsmodellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit charakterisiert, die MHC-Klasse-I Antigenpräsentation zu inhibieren. Die Identifizierung und Strukturanalyse von Interferenzfaktoren wird in Zukunft die Entwicklung von Therapeutika ermöglichen, die gezielt die Wirkung viraler immunsuppressiver Proteine ausschalten.

Dieser Abschnitt erhebt nicht den Anspruch einer vollständigen Darstellung aller Methoden, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Vielmehr sollen die komplexeren Methoden des Ergebnisteiles B erläutert werden. Standardverfahren oder Methoden, die in den Publikationen des II. Abschnitts ausführlich dargestellt sind, werden in diesem Abschnitt nicht aufgeführt. Methodische Hinweise sind auch in den Legenden der Abbildungen zu finden.

5.1. Klonierung von cDNAs in Plasmidvektoren

Um Protein-Protein-Interaktionen im "yeast two-hybrid"-System nachzuweisen wurden die cDNAs der potentiellen Interaktionspartner in die Plasmidvektoren pAS-2-1 und pACT-2 (Clontech) kloniert. Die Amplifikation der entsprechenden cDNAs erfolgte aus murinen (PA28 α , β , γ ; MC6) oder humanen cDNA Banken (PA28 γ ; Stratagen) oder aus Vorläuferkonstrukten (mPA28 α , mPA28 β ; Soza et al., 1997) mittels PCR (Temperatur-Zyklus-Automat (Biometra); PCR-Kit "GeneAmp PCR Core Reagents" (Perkin Elmer). Die verwendeten Oligonukleotidprimer sind in den Tabellen 5-8 aufgeführt. Alle Oligonukleotidprimer wurden von BioTeZ Berlin-Buch GmbH bezogen.

5.1.1. DNA-Amplifikation durch die "Polymerase Chain Reaction" (PCR)

Standard-PCR: Matrizen-DNA und Oligonukleotide wurden vor Zugabe zum PCR-Ansatz 7 min bei 95°C denaturiert. Nachfolgend aufgeführt ist die finale Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes (100 μ l): 2 μ l DNA (10ng/ml), je 1.5 μ l 5'- und 3'-Oligonukleotid (100pmol/ μ l), 10 μ l 10 x PCR-Puffer II, 10 μ l MgCl₂ (25 mM), je 2 μ l dNTP (0.2mM), 0.5 μ l Taq-Polymerase (2.5 U) und aqua dest. ad 100 μ l. Die Ansätze wurden in 0.5ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit jeweils 100 μ l Paraffin überschichtet. Standardbedingungen für die PCR (1min 94°C; 1min 40°C; 1min 72°C; 30 Zyklen; 7min 72°C) wurden bei einigen Primer/Template- Kombinationen optimiert.

Assemblierungs-PCR: Aminosäuresubstitutionen und Deletionen wurden in das PA28 α -Protein über die Methode der überlappenden PCR-DNA Fragmente eingeführt. Bei dieser Methode wurde die zu amplifizierende cDNA zunächst in zwei überlappenden DNA-Fragmenten separat amplifiziert. PCR 1 repräsentierte das 5'-Ende der cDNA bis zu dem Sektor, der die Mutation enthält, PCR 2 überlappte mit der zu mutierenden Sequenz aus PCR 1 und umfaßte das 3'-Ende der cDNA. Die Mutationen wurden über die Amplifikationsprimer in die cDNA eingeführt. Ein antisense-Primer repräsentierte die zu mutierende Sequenz in PCR 1, der komplementäre sense-Primer in PCR 2. Die externen 5'- und 3'-Primer der vollständigen cDNA sind in Tabelle 5 und 6 aufgeführt. Der 5'-Primer wurde in PCR1, der 3'-Primer in PCR 2 zusammen mit den internen Primern (Tabelle 7) eingesetzt. Die Fragmente aus PCR 1 und PCR 2 wurden gelelektrophoretisch gereinigt, um die internen Mutageneseprimer abzutrennen. Danach wurden die gereinigten DNA-Fragmente gemischt und bei 95°C in Einzelstränge geschmolzen. In der sich anschließenden Hybridisierung wurden die Einzelstrangfragmente aus PCR 1 mit den überlappenden Bereichen aus PCR 2 hybridisiert. In der folgenden Polymerasereaktion wurden die komplementären DNA-Stränge in Abwesenheit von Primern aufgefüllt.

Anschließend erfolgte in Gegenwart beider externer Primer eine weitere Standard-PCR-Amplifikation. Die DNA-Fragmente wurden wiederum gereinigt, mit den geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten und in die entsprechenden pGEX, pACT2 und pAS2-1-Vektoren ligiert.

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden in 1%igen Agarosegelen identifiziert (Maniatis et al., 1989) und von unerwünschten DNA-Kontaminationen aus ausgeschnittenen Gelfragmenten isoliert (Gel-Extraktions-Kit, QIAGEN). Zur Restriktionsanalyse und zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden Standardverfahren (Restriktionsverdau, DNA-Ligation, Transformation von Bakterien, Miniprüpanalyse der Plasmid-DNA, Midipräp-Aufreinigung von Plasmid-DNA) nach Maniatis et al., (1989) oder nach den Produktbeschreibungen der Hersteller ("Plasmid Extraction Kit", QIAGEN) eingesetzt.

Tabelle 5: 5'-und 3'Oligonukleotidprimer für pGEX-Konstrukte

cDNA	Primer	Sequenz	Enzym
mPA28 α	4969-33	5'-GAGGGATCCATGGCCACACTGAGGGTCCATCC-3'	BamHI
	428-31	5'-GTGGAATTCTCAATAGATCATTCCCTT-3'	EcoRI
mPA28 β	123-31	5'-GAGGAATTCCAAGCCTTGTGGGGTCCGCTTG-3'	BamHI
	3877-33	5'-AAACTCGAGTCAGTACATAGATGGCTTTTCTTC-3'	XhoI
hPA28 γ	4968-31	5'-GAGGGATCCATGGCCTCGTTGCTGAAG-3'	BamHI
	1974-33	5'-GAGGATCCTCAGTACAGAGTCTCTGCATTGCTG-3'	BamHI

Restriktionsschnittstelle und erstes "in frame"-Codon sowie "stop"-Codons sind unter-strichen.

Tabelle 6: 5'-und 3'Oligonukleotidprimer für YTH-Konstrukte pAS2-1 und pACT2

cDNA	Primer	Sequenz	Enzym
mPA28 α	3016-38	5'-GAGGATCCCAATGGCCACACTGAGGGTCCATCCCGAAG-3'	BamHI
	3017-36	5'-CCACTGCAGTCAATAGATCATTCCCTTGTTTCTCCAC-3'	PstI
	3018-38	5'-CCACTCGAGTCAATAGATCATTCCCTTGTTTCTCCAC3'	XhoI
mPA28 β	3012-38	5'-GAGGGATCCGAATGGCCAAGCCTTGTGGGGTCCGCTTG-3' 5'-	BamHI
	3013-36	GCCCTGCAGTCAGTACATAGATGGCTTTTCTTCACC-3'	PstI
	3876-31	5'-GAGGAATTCTAGCCAAGCCTTGTGGGGTCCG-3'	EcoRI
	3877-33	5'-AAACTCGAGTCAGTACATAGATGGCTTTTCTTC-3'	XhoI
hPA28 γ	1973-29	5'-GAGGATCCTGGCCTCGTTGCTGAAGGTGG-3'	BamHI
	1974-33	5'-GAGGATCCTCAGTACAGAGTCTCTGCATTGCTG-3'	BamHI
	3019-32	5'-GAGGATCCGTATGGCCTCGTTGCTGAAGGTGG-3'	BamHI

Tabelle 7: Interne Mutageneseprimer für PA28a-Konstrukte

cDNA	Primer	Sequenz	Mutation
mPA28 α	1990-30/s	5'-GACCCAGTCAGAGAGAGAGAGAAGGAGGAG-3'	K2R
	1991-30/as	5'-CTTCTCTCTCTCTCTGACTGGGTCGGGTAC-3'	K2R
	3014-34/s	5'-GAGAAGGAAGAGAGGAGAGAGGGGACGAAGACG -3'	K3R
	3015-34/as	5'-CGTCTTCGTCCCCCTCTCCTCCTCTCTTCCTTCTC -3'	K3R
	3414-38/as	5'-CCTTTGTCGTCTTCGTCCCCGACTGGGTCGGGTACTGG-3'	Δ KEKE
	3415-21/s	5'-GGGGACGAAGACGACAAAGGT -3'	Δ KEKE

Die Orientierung der Mutageneseprimer ist angegeben: s = sense; as=antisense . Die Abkürzungen K2R und K3R bezeichnen die Mutationspositionen im KEKE-Motiv 70-91. Es wurden die Lysine 70 und 72 (K2R) oder/und die Lysine in Position 89, 90, 91 (vgl. Abb. 10A) in Arginine mutiert. Das Konstrukt Δ KEKE entspricht der Deletion des gesamten KEKE-Motivs (Pos.70-91).

Tabelle 8: Oligonukleotidprimer zur Klonierung der α 4/MC6-UE in THS-Vektoren

cDNA	Primer	Sequenz	Enzym
MC6	4696-31/s	5'-CCAGGATCCTGATGAGCTACGACCGCGCCAT-3'	BamHI
	4697-31/as	5'-CCACTGCAGTCATGATGCTTTCTTTTGTTCCTTCTT-3'	Pst I
	4698-36/as	5'-CCACTCGAGTCATGATGCTTTCTTTTGTTCCTTCTT-3'	Xho I

Die Oligonukleotidprimer zur Klonierung der MC6-Proteasom-UE der Maus wurden aus der Sequenz der C6-cDNA aus Ratte abgeleitet (Ni et al., 1995).

In analoger Weise wurden cDNAs der PA28-Genfamilie in Plasmidvektoren der pGEX-Serie (pGEX-2TK, pGEX-4T3; Pharmacia) kloniert, um rekombinante Fusionsproteine affinitätschromatographisch über die Bindung des Glutathion-S-Transferase-Anteils an reduziertes Glutathion (Sigma) aufzureinigen. Die verwendeten Oligonukleotidprimer sind ebenfalls in Tabelle 5 aufgeführt. Restriktionsschnittstellen zur Klonierung sind unterstrichen. Alle Plasmidkonstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung (Ina Wagner, MPI für Infektionsbiologie) überprüft. Die Herstellung der pGEX- Konstrukte war Bestandteil der Diplomarbeit von Ulrike Salzmann. Die Sequenzen wurden mit den entsprechenden Softwareprogrammen (DNA Strider; Datenbanken: EMBL, Genbank, Swissprot etc) abgeglichen um etwaige PCR-generierte Mutationen zu identifizieren.

5.2. Etablierung eines Rekonstitutionssystems der Proteasomaktivierung

5.2.1. Aufreinigung des 20S-Proteasoms aus Geweben und Zelllinien

Das 20S-Proteasom wurde aus RMA- und B8-Zellen sowie aus verschiedenen Geweben der Maus gereinigt, und mittels 2D-Gelelektrophoresetechniken (IEF und NEPHGE) charakterisiert. Das Standardverfahren zur Aufreinigung latenten 20S-Proteasoms aus Mausleber (Stohwasser et al., 1996) beinhaltet den **Zellaufschluß** (Lysepuffer: 10 mM HEPES pH 7.2, 80mM KAc, 5mM MgCl₂, 0.1 % Triton; Ultra-Turrax T25; Dounce-

Homogenisator, 20-30x; 4°C; Zentrifugation 20 min, 16500 rpm, Sorvall SS 34-Rotor), eine **DEAE-Anionenaustauschchromatographie** (Waschpuffer: 10 mM HEPES pH 7.2, 80 mM KAc, 5mM MgCl₂; Elutionspuffer: 10 mM HEPES pH 7.2, 500 mM KAc, 5mM MgCl₂; DEAE-Sephacel, PHARMACIA), **Einengung des Eluates durch Ultrafiltration** (Modell 8050 50 ml AMICON; Diaflo Membranen XM300, Ausschlußgröße 300 kD, Ø 43 mm), eine **Dichtegradientenzentrifugation** (Saccharosegradient 10-40% in 10 mM HEPES pH 7.2, 500 mM KAc, 5mM MgCl₂; Ultrazentrifugation, 15 h 49, 40000 rpm, 4°C, SW40-Rotor BECKMAN), **Fraktionierung** (600 µl Fraktionen) und die **Identifizierung des 20S-Proteasoms in Fraktion 9-14 durch Aktivitätstests mit fluorogenem Substrat** (50 µM Suc-LLVY-AMC). Die aktiven Fraktionen wurden **durch Ultrafiltration** (AMICON XM300) auf Puffer A gestellt (Puffer A: 10 mM HEPES pH 7.2, 100 mM KCl, 5mM MgCl₂; Puffer B: 10 mM HEPES pH 7.2, 1 M KCl, 5mM MgCl₂) und über eine **MonoQ-Säule** (HR5/5 PHARMACIA) mit einer Flußrate von 1 ml/min fraktioniert. Das FPLC -Programm bestand aus folgenden Schritten: 6 ml 100 mM Puffer A, 6.5 ml 0% - 25% Puffer B, 10 ml 25%-35% Puffer B, 3.5 ml 35%-45% Puffer B und 4.0 ml 45%-100% Puffer B. Aktive 20S-Proteasom-Aliquots wurden bei -70°C gelagert.

5.2.2. Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Vorkulturen von pGEX-PA28-transformierten Bakterien (E. coli; Stamm: DH5α; 3-10 ml Übernachtskultur in LB-Amp/2% Glucose; 37°C Schüttelinkubator) wurden als Inokulum für **Hauptkulturen** (300-1000 ml) verwendet. Nach 3-4-stündiger Kultivierung (OD₆₀₀: 0.6-0.8) wurde die **Expression** rekombinanter GST-PA28-Fusionsproteine mittels IPTG (2 mM) induziert (1h; 30 °C, Schüttelinkubator 230 rpm). Nach der Induktion wurden die Zellpellets (**Ernte**: 15min, 4000rpm, GS-3-Rotor, 4°C; Sorvall-Zentrifuge) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Nach dem langsamen Auftauen auf Eis wurden die bakteriellen Zellpellets in 7-20 ml eiskaltem PBS-Puffer (1xPBS, pH 7.2: 10mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 140mM NaCl, 2.7mM KCl) resuspendiert. Der **Zellaufschluß** erfolgte durch Ultraschallbehandlung auf Eis (300 ml-Pellets; 5 min; 50% Pulse bei maximaler Amplitude; Sonopuls Ultraschall-Homogenisator (Mikrospitze MS 73) BANDELIN) oder mittels 2-maliger Passage der Frenchpress (1000 ml -Pellets) bei 750 psi. Die Zellhomogenate wurden durch Zentrifugation (15min, 14000rpm, 4°C, SS-34-Rotor) in lösliche Proteinfraction (Lysat) und unlösliche Fraction (Sediment aus Zelltrümmern und Inklusionbodies) getrennt. Die affinitätschromatographische Aufreinigung der GST-PA28 Fusionsproteine erfolgte aus dem Überstand dieses Zentrifugationsschrittes.

Fusionsproteine aus dem Überstand wurden an 80-240 mg PBS-äquibrierter **Glutathion-Agarose** (SIGMA) gebunden (Inkubation bei RT, 10 min). Die weitere Aufreinigung wurde entweder im Batch-Verfahren (4 x 25 ml-Waschschritte in 1 x PBS auf Drehinkubator / Sedimentation der Agarose in Sorvall-Zentrifuge (SS-34 Rotor): 3 min 1000 rpm 4°C) oder säulenchromatographisch (Waschschritte mit 10-fachem Säulenvolumen) durchgeführt.

Die rekombinanten PA28-Proteine (recPA28α, recPA28β, recPA28γ) wurden durch limitierten **Thrombinverdau** (2h bei 37°C) der agarosegebundenen Fusionsproteine freigesetzt (2U biotinyliertes Thrombin/mg Fusionsprotein; Thrombin-Puffer: 20mM Tris-HCl pH 8.4, 150mM NaCl, 2.5mM CaCl₂). Ursprünglich erfolgte der

Thrombinverdau über Nacht bei 8°C. Es zeigte sich jedoch (Salzmann, 1998; Diplomarbeit), daß insbesondere recPA28 β unter diesen Bedingungen ein vermindertes Aktivierungspotential aufwies, das durch Vorinkubation bei höheren Temperaturen gesteigert werden konnte. Realini et al. (1997) beobachteten ebenfalls eine Temperaturabhängigkeit der Aktivierung des Proteasoms durch "REGs" (recPA28-Proteine).

Das biotinylierte Thrombin wurde im Batch-Verfahren aus dem Überstand oder im Säulenverfahren aus dem Durchlauf mit Elutionspuffer (Thrombinpuffer, pH 7.5) mittels **Streptavidin-affinitätschromatographie** ("Thrombin-Cleavage-Capture-Kit", NOVAGEN) vollständig entfernt. Der Erfolg dieses Schritts wurde durch Inkubation der rekombinanten PA28-Proteine in Abwesenheit von 20S-Proteasom mit verschiedenen fluorogenen Peptidsubstraten und längeren synthetischen Peptiden überprüft. Eine massenspektrometrische Qualitätskontrolle bestätigte die Integrität des recPA28 α -Proteins. Eine entsprechende Analytik des recPA28 β -Proteins liegt noch nicht vor (T. Ruppert, persönliche Mitteilung). Nach Proteinbestimmung (BCA, PIERCE) wurden die recPA28-Proteine mit Glycerin versetzt (20%) und in Aliquots bei -70°C gelagert.

5.2.3. Kinetische Modellierung der Aktivierung des 20S-Proteasomes

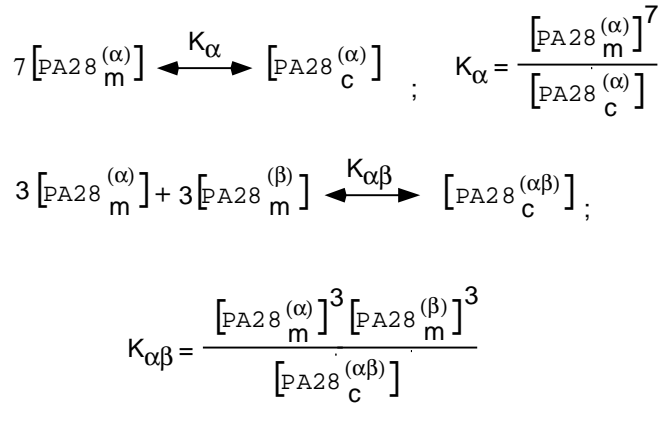
Die Aktivierung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des 20S-Proteasoms durch recPA28-Proteine wurde unter Verwendung des fluorogenen Substrates Suc-VVLY-MCA (200 μ M) vermessen. Es wurden konstitutive Proteasomen aus B8-Fibroblasten sowie Immunoproteasomen aus B27-Tripletransfektanten eingesetzt. Die 20S-Proteasomen (50 oder 100 ng) wurden mit variierenden Konzentrationen rekombinanter PA28-Proteine (0-2500ng) in 25 μ l Vorinkubationspuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM DTT, 4-8% Glycerin) bei 37°C vorinkubiert, um die Assemblierung von Aktivatorkomplexen und die Gleichgewichtseinstellung für die Bindung an das 20S-Proteasom zu gewährleisten. Nach 30 min wurden die 25 μ l Vorinkubationsmix zu 75 μ l Substratpuffer (267 μ M Suc-VVLY-MCA in 50 mM Tris pH 7.5, 25 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA) pipettiert. Die Linearität der hydrolytischen Freisetzung von MCA im 100 μ l Reaktionsansatz wurde durch Messungen nach 15, 30, 45 und 90 min sichergestellt.

Der kinetischen Modellierung der Aktivierung der Suc-VVLY-MCA-hydrolysierenden Aktivität des 20S-Proteasoms durch ansteigende Konzentrationen von recPA28 α , recPA28 β oder recPA28 α + β wurde die Annahme zugrunde gelegt, daß sowohl monomere recPA28-Proteine als auch die assoziierten oligomeren Komplexe zur Nettoaktivierung des 20S-Proteasoms beitragen können. Dieser Sachverhalt ist in der Gleichung (1.1) zusammengefaßt:

$$(1.1) \quad v = \frac{v_m \frac{[PA28_m]}{K_m} + v_c \frac{[PA28_c]}{K_c}}{1 + \frac{[PA28_m]}{K_m} + \frac{[PA28_c]}{K_c}}$$

Die Subskripte (m) und (c) stehen für die monomeren bzw. die komplexierten Formen von PA28. Die Dissoziationskonstanten K_m und K_c (siehe auch Tabelle 1: K_{mono} and $K_{complex}$) sind ein Maß der Bindungsaffinitäten der respektiven PA28-Komplexe an das 20S-Proteasom. Die maximalen Aktivitäten monomer- und komplex-aktivierter Proteasomen sind als V_m und V_c ausgedrückt.

Die Bildung heptamerer PA28 α - und hexamerer PA28 $\alpha\beta$ -Komplexen wird durch die Gleichungen in (1.2) ausgedrückt:



(1.2)

Die Bildung heptamerer PA28 β -Komplexe wurde in analoger Weise abgehandelt. Die Konzentration der freien Monomere wurde nach Newton's Verfahren zur Lösung nicht-linearer Gleichungen berechnet (1.3).

Die Gesamtkonzentration der PA28 α - und PA28 β -Monomere ist als $[\text{PA28}_m^{(a)}]_{\text{total}}$ und $[\text{PA28}_m^{(b)}]_{\text{total}}$ gegeben:

$$[\text{PA28}_m^{(\alpha)}] + 7[\text{PA28}_c^{(\alpha)}] = [\text{PA28}_m^{(\alpha)}]_{\text{total}}$$

$$[\text{PA28}_m^{(\alpha)}] + [\text{PA28}_m^{(\beta)}] + 6[\text{PA28}_c^{(\alpha\beta)}] = [\text{PA28}_m^{(\alpha)}]_{\text{total}} + [\text{PA28}_m^{(\beta)}]_{\text{total}}$$

(1.3)

Die numerischen Lösungen der Gleichungen in (1.3) ergaben die Konzentrationen der Monomere und der Aktivatorkomplexe. Nach Einsetzung der numerischen Werte in Gleichung 1.1 und der computergestützten Modellierung ergaben sich die gefitteten Kurven in Abb. 7 und die kinetischen Parameter in Tabelle 1. Die dem Modell zugrunde liegenden Messungen wurden in drei Experimenten mit jeweiliger Dreifachmessung (n=3) gewonnen. In Abb. 7 ist die Auswertung eines repräsentativen Experimentes dargestellt.

5.2.4. Kinetik der Proteasomaktivierung: fluorogene Substrate

Peptidaseaktivitäten des 20S-Proteasoms (50-100ng) wurden mit fluorogenen Peptidsubstraten (BACHEM) in 96-Loch-Mikrotiterplatten (Fluorimeter: Fluostar STL) gemessen. Verwendet wurde Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität, CHTR), Bz-Val-Gly-Arg-AMC (Trypsin-ähnliche Aktivität, TRYP) und Z-Leu-Leu-Glu-βNa (Caspase-ähnliche Aktivität, PGPH). Die Umsetzung der Substrate in 75 µl Substratpuffer (50mM Tris pH 7.5, 25mM KCl, 10mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT) wurde durch Zugabe von 25 µl Enzymmix gestartet. Der Enzymmix enthielt das 20S-Proteasom (50-100ng) und Effektoren (recPA28-Proteine 1.25-2.5 µg). 20S-Proteasom und Effektoren wurden in der Regel 30 min vorinkubiert, um Komplexbildung zu ermöglichen. Diese Vorinkubationszeiten wurden in Optimierungsexperimenten ermittelt. In solchen Vorinkubations-kinetiken erreichten die gemischten recPA28αβ-Proteine das Maximum ihres Aktivierungspotentials in 10-20 min (Experimente nicht gezeigt).

Im enzymatischen Assay wurde die Abspaltung der fluorogenen Gruppe bei einer Anregungswellenlänge von 390nm (AMC) bzw. 355nm (β-Na) und einer Emission von 460nm (MCA) bzw. 405nm (β-Na) erfaßt. Die experimentellen Daten wurden mittels der Geschwindigkeitsgleichung (2.1) ausgewertet:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \left(\frac{S_1}{[S]} \right)^n + \left(\frac{[S]}{S_2} \right)^m} \quad (2.1)$$

5.2.5. Kinetik der Proteasomaktivierung: Inhibierung mit einem HBx-Peptid

Die Aktivierung des Proteasoms durch recPA28α oder recPA28αβ wurde durch Bindung eines synthetischen HBx-Peptides (116-LFKDWEELGEEIRLKVFLGGCR-138) inhibiert (Abschnitt 3.3.1.; Abb. 19). Das Peptid repräsentiert die Interaktionsdomäne des HBx-Proteins mit der α4/C6-UE (Fischer et al. 1995; Huang 1996). Zur Messung des inhibitorischen Effektes auf die Proteasomaktivierung wurden das 20S-Proteasom (0.7 nM) mit verschiedenen Konzentrationen von HBx-Peptid (1-10 mM Stammlösung in DMSO; Inhibitorkonzentration: 0.1-100 µM; höchste finale DMSO-Konzentration: 1% (v/v)) vorinkubiert (15 min, 4°C; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5). Es folgte eine weitere Vorinkubation in Substratpuffer (50 mM Tris pH 7.5, 25 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA) in Gegenwart von 1 µg recPA28α oder recPA28αβ. Bei einer zugrunde gelegten vollständigen Assemblierung würde die theoretische Heptamerkonzentration bei 50 nM liegen (Ausgangskonzentration Monomer: 350 nM). Die aus dem Assemblierungsmodell in Abschnitt 3.1.4 / Abb. 7 errechneten Verhältnisse Heptamer:Monomer waren jedoch wesentlich niedriger und betrugen für eine angenommenen Monomer-Konzentration von 1 µM 80%:20% für recPA28α und 60%:40% für recPA28αβ. Für recPA28α wurde von Johnston et al. (1997) unter diesen Bedingungen ein Verhältnis von 50% Heptamer : 50% Monomer ermittelt. Für recPA28αβ liegen bisher keine vergleichbaren Daten vor.

Im Anschluß an beide Vorinkubationen wurde die Peptidaseaktivität des Proteasoms mit dem Suc-LLVY-MCA Substrat über einen Konzentrationsbereich von 0-400 µM gemessen.

Nach HPLC-Analyse und massenspektroskopischer Untersuchungen unserer Inhibierungsansätze durch Dr. T. Ruppert konnten keine Degradationsprodukte des HBx-Peptides nachgewiesen werden. Demnach kommt der inhibitorische Effekt nicht durch Kompetition des putativen HBx-Peptides mit dem fluorogenen Substrat zustande. Diese Untersuchungen zeigten jedoch auch, daß das HBx-Peptid in unseren Inkubationsansätzen als Dimer vorliegen kann. Eine Dimerisierung über kovalente Verknüpfung der Cysteinreste in Position 137 wird angenommen.

Die Reduktion der PA28-vermittelten 20S-Proteasom-Aktivierung durch das HBx-Peptid wies einen biphasischen Verlauf auf. Eine solche biphasische Abhängigkeit kann als Ausdruck von zwei Bindungsorten für den Inhibitor interpretiert werden. Die experimentellen Daten wurden daher mittels der Geschwindigkeitsgleichung (3.1) modelliert:

$$A = \frac{1 + \frac{1}{2} \left(\frac{1}{K_{i1}^*} + \frac{1}{K_{i2}^*} \right) [HBx]}{\left(1 + \frac{[HBx]}{K_{i1}^*} \right) \left(1 + \frac{[HBx]}{K_{i2}^*} \right)}$$

(3.1)

Hierbei ist A die relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der HBx-Konzentration.

Der Modellierung unserer experimentellen Daten mittels Geschwindigkeitsgleichung (3.1) wurden folgende Annahmen zugrunde gelegt: (1) Die Kompetition von HBx-Peptid und recPA28-Proteinen erfolgt um gemeinsame Bindungsstellen an den beiden $\alpha 4/C6$ -UE eines 20S-Proteasomes. Diese Vorstellung basiert auf unseren PPI-Ergebnissen und der Tatsache, daß Huang et al. 1996 außer der $\alpha 4/C6$ -UE des Proteasoms keine weiteren Bindungsorte des HBx-Proteins lokalisieren konnten.

(2) Unterschiedliche Affinitäten der beiden Bindungsstellen für die Bindung von HBx an $\alpha 4/C6$. (3) Halbmaximale Enzymaktivität, wenn nur eine $\alpha 4/C6$ -UE mit PA28 besetzt ist.

Die beiden Parameter K_{i1}^* und K_{i2}^* in Gleichung (3.1) stehen zu den apparenten Dissoziationskonstanten der beiden möglichen HBx-C6-Komplexe über Gleichung (3.2) in Beziehung:

$$K_i^* = \frac{K_i}{1 + \left(\frac{[PA28\alpha]}{S_{0.5}} \right)^n} \quad (i=1,2)$$

(3.2)

Die Aktivierung des 20S-Proteasoms durch recPA28 α und recPA28 $\alpha\beta$ ließ sich zunächst vereinfacht auch mit einem Hill-Modell mit den Parametern $S_{0.5}$ und n beschreiben. Die in Abb. 7 dargestellten Modellierungen mit Geschwindigkeitsgleichung 1.1 ergab jedoch eine bessere Beschreibung der experimentellen Daten und wurde daher im Ergebnisteil dargestellt.

5.2.6. Statistische Methoden bei Modellierungen

Das Fitting von Geschwindigkeitsgleichungen und experimentellen Daten erfolgte nach der Methode der Minimierung der kleinsten Quadrate. Die Qualität der Modellierung wurde über die Summe der kleinsten Quadrate ermittelt:

$$(4.1) \quad SLS = \sum_{i=1}^{n_{\text{points}}} (y_i - f(x_i))^2$$

Mit y werden die Meßpunkte bezeichnet und $f(x_i)$ gibt die Modell-Werte nach Minimierung der kleinsten Quadrate an. Die Qualität einer Modellierung kommt im Bestimmtheitsmaß (r^2) zum Ausdruck (Gleichung 4.2). :

$$(4.2) \quad r^2 = \frac{SD}{SLS + SD}$$

In diese Beziehung geht neben der Summe der kleinsten Quarate die Standardabweichung mit ein (Gleichung 4.3):

$$(4.3) \quad SD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_i^n (\bar{y} - y_i)^2}$$

Ein Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 1$ entspricht einem perfekten Fit mit einem Wert von $SLS = 0$.

5.2.7. Kinetik der Proteasomaktivierung: synthetisches pp89-Peptidsubstrat

Da fluorogene Peptidsubstrate außergewöhnlich kurze Substrate aus dem Spaltungsrepertoire des 20S-Proteasoms darstellen, wurde ein längeres synthetisches Peptid als Substrat verwendet, um den aktivierenden Einfluß der recPA28-Proteine zu untersuchen. Das 25-mer RLMYDMYPHFMPNLGPSEKRVWMS (Nonamerepitop unterstrichen) stammt aus dem pp89-Protein des Mauscytomegalovirus (MCMV).

Das pp89 25-mer (20 µg/ 150 µl = 44 µM) wurde in Reaktionspuffer (20 mM Hepes KOH, pH 7.8, 2 mM MgAc₂, 1 mM DTT) bei 37°C mit 20S-Proteasom (500 ng 20S-Proteasom aus Leber der Maus) in Gegenwart von recPA28-Proteinen (10 µg) inkubiert. Zu den Zeiten t_0 , t_{60} min und t_{300} min wurden dem Reaktionsansatz Proben für HPLC-Analyse und Massebestimmung der Peptidprodukte entnommen. Die HPLC-Analyse wurde wie in [5] dargestellt durchgeführt (HPLC-System Gold BECKMAN; NPS HPLC Column MICRA SCIENTIFIC, INC. (RP 181.5µm). Elutionspuffer A: 0.05% TFA; Elutionspuffer B: 70% Acetonitril 0.05% TFA. Die massenspektroskopische Analyse wurde von Dr. T. Ruppert durchgeführt.

5.3. Zellfraktionierung und Nukleoplasmapräparation

Eine lymphoblastoide T-Zelllinie wurde zur Zellfraktionierung eingesetzt. Die Zellen wurden 72 Stunden in Gegenwart von 15 U IFN- γ /ml oder ohne IFN- γ kultiviert. 2×10^9 RMA-Zellen wurden in 10 ml 80 mM KAc-Puffer (80 mM KAc, 5 mM MgAc₂, 10 mM Hepes pH 7.2) aufgenommen und durch 20-30 x Dounce-Homogenisierung (S-Pistell; 4C) aufgeschlossen. Die Kernfraktion der 600 x g Zentrifugation (15 min SS34, Sediment) wurde in 27 ml Kernpuffer A (1.3 M Saccharose, 10 mM HEPES pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 1 mM Spermidin, 1mM DTT)) resuspendiert und durch ein Saccharosekissen aus 8 ml Kernpuffer B (2 M Sucrose, 10 mM HEPES pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 1 mM Spermidin, 1mM DTT) zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge: SW28 18000 rpm 45 min), um cytosolische Kontaminationen zu minimieren. Die Qualität der Kernfraktion (4×10^8 sedimentierte Kerne) wurde mikroskopisch überprüft. Die Kernfraktion wurde in Kernlagerungspuffer eingefroren (25 % Glycerin, 50 mM HEPES pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 1 mM Spermidin, 1mM DTT) oder sofort weiterverarbeitet. Die Kerne wurden in hypotonem Puffer sonifiziert und auf Glycerolgradienten (10-40% Glycerin in 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM β -Mercaptoethanol) aufgetragen. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte im Rotor SW40 (16h, 40000 rpm, 4°C). Der Gradient wurde in 22 Fraktionen à 600 μ l fraktioniert. Aliquots der Fraktionen wurden mit TCA gefällt. Die Nukleoplasmaproteine wurden in Mini-SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt, im Semidry-Verfahren (BIOMETRA) auf Nitrozellulose transferiert und mit polyklonalen Kaninchenseren auf das Vorhandensein von PA28 γ (K#58.4), PA28 α (K#39.3), PA28 β (K#3-88) und auf 20S-UE (K#MP3) sowie auf PA700-UE (p31) getestet. Hierzu wurden ein Peroxidase-gekoppelter 2. Antikörper ("goat anti rabbit"; DIANOVA) sowie ein ECL-Kit ("enhanced chemiluminescence" -Reagenz; BOEHRINGER MANNHEIM) verwendet.

5.4. Nachweis von PPI mit der "Yeast Two-Hybrid"-Methode

Eine ausführliche Darstellung der Methoden ist den Instruktionen zum MATCHMAKER Two-Hybrid System 2 (K1604-1) von CLONTECH zu entnehmen ("Yeast Protocols Handbook" (PT3024-1) und "MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid User Manual" (PT3061-1). Es folgt eine kurze Übersicht der wichtigsten Prinzipien dieses Testsystems für PPI.

5.4.1. Testprinzip des YTH-Systems

Der Transkriptionsaktivator GAL 4 besteht aus einer DNA-bindenden Domäne (DB) und einer transaktivierenden Domäne (AD). Die Kombination dieser Domänen bewirkt die Aktivierung des Reportergens.

5.4.2. Klonierungsvektoren: Eigenschaften von pAS-2-1 und pACT-2

Im YTH-System werden die GAL4-DB- und die GAL4-AD-Proteindomänen nach Transfektion in geeignete Hefestämme von zwei verschiedenen Plasmiden exprimiert: GAL4-DB-Fusionsproteine werden von pAS2-1, GAL4-AD-Fusionsproteine von pACT2 exprimiert. Jedes dieser Plasmide trägt das Gen für einen Selektionsmarker. pAS2-1-Plasmide komplementieren über ihr TRP1-Gen das Wachstum Tryptophan-auxotropher Hefestämme. pACT-2 -Plasmide hingegen komplementieren mittels ihres LEU2-Gens Leucin-

auxotrophe Hefen. Daher können auf den entsprechenden Selektionsagarplatten Hefen identifiziert werden, die jeweils eines der beiden Plasmide oder beide Plasmide im Verlauf der Transformation erhalten haben.

Die separierten GAL-4-Domänen sind transkriptionell inaktiv. Der GAL4-Transkriptionsaktivator kann jedoch durch Protein-Protein-Interaktionen von fusionierten Proteininteraktionspartnern rekonstituiert werden. Hierzu werden die potentiellen Partner als Fusionsproteine der DB-Domäne und der AD-Domäne in pAS2-1 ("bait"-Konstrukt) und pACT-2-Vektoren ("prey"-Konstrukt) kloniert und in Hefen kotransfiziert. Eine Alternative zur Kotransfektion stellt das "Mating" dar, bei dem haploide Hefeklonen des α -Typs (Träger des bait-Konstruktes) und des α -Typs (Träger eines prey-Konstruktes) zur diploiden Hefe verschmelzen. Die Fusionsproteine, die von dem pAS2-1-Konstrukt und dem pACT2-Konstrukt exprimiert werden (z.B. PA28 α und PA28 β), werden aufgrund eines Kernlokalisierungssignals in den Hefenukleyus transportiert. Im Falle einer Interaktion der beiden Fusionsanteile wird der GAL4-Transkriptionsaktivator funktionell rekonstituiert, da die GAL4-DB- und GAL4-AD-Domäne in räumliche Nachbarschaft gebracht werden. Die Protein-Protein-Interaktion wird dann als Aktivierung einer Reportergenaktivität gemessen. In den hier vorgestellten Experimenten wurde vornehmlich die β -Galaktosidaseaktivität gemessen. In einigen Versuchen wurde zusätzlich das HIS3-Reportergen verwendet. Seine Aktivierung komplementiert die Histidin-Auxotrophie der verwendeten Hefestämme.

5.4.3. Reportergenaktivierung

Die Reportergene β -Galaktosidase und HIS3 stehen in den verwendeten Hefestämmen unter der Kontrolle artifizierlicher Promotoren (CG1945: lacZ \rightarrow UAS_{G17-mer}; HIS3 \rightarrow GAL1; Y187: lacZ \rightarrow GAL1, ; Y190: lacZ \rightarrow GAL1, HIS3 \rightarrow GAL1), die aus TATA-Boxelementen und UAS ("upstream activating sequences")-Elementen konstruiert wurden. Diese DNA-Sequenzmotive werden von den GAL4-DB-Domänen erkannt.

5.4.4. Ausschluß von falschpositiven Interaktionen

Bevor Protein-Protein-Interaktionen im YTH getestet werden können, muß sichergetellt werden, daß die verwendeten pAS2-1- und pACT2 -Konstrukte keine autonome Transkriptionsaktivierung bewirken. Diese Kontrolle ist notwendig, da Fusionsanteile in DB-Konstrukten möglicherweise Aktivierungsdomänen besitzen und umgekehrt Fusionsanteile in AD-Vektoren häufig DNA-bindende Eigenschaften haben können. Daher wurden alle Konstrukte vor der Durchführung von Interaktionstests daraufhin überprüft, ob sie eine autonome Transkriptionsaktivierung der Reportergene bewirken (Bartel et al., 1993).

5.4.5. Nachweis der β -Galactosidase-Reportergenaktivitäten

Protein-Protein-Interaktionen zwischen GAL4-DB- und GAL4-AD-Fusionsproteinen wurden gemessen, indem die Aktivierung von Reportergenen erfaßt wurde. Das HIS3-Reportergen ermöglicht Wachstum auf His-freiem Medium. Ein Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität im Filterassay oder im Flüssigassay war indikativ für eine Aktivierung des UAS des β -Galaktosidasereportergens durch den rekonstituierten GAL4-Transkriptionsfaktor. Durch Verwendung beider Reportergene des Stammes CG1945 wurde die Wahrscheinlichkeit von

falschpositiven PPIs gesenkt, da HIS3- und β -Galaktosidase-Reportergen in diesem Hefestamm verschiedene UAS besitzen.

Filterassay

Transformierte Hefekolonien wurden von Kulturplatten auf NC-Filter transferiert und 10 sec in flüssigen Stickstoff eingebracht. Die NC-Filter wurden auf Whatmanpapier aufgelegt, das mit Indikatormedium getränkt war (334 μ g 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β D-galacto-pyranosid (X-Gal) in 100 ml Z-Puffer: 60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, pH7.0; 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 50 mM β -Mercaptoethanol). Eine blaue Farbentwicklung innerhalb von 0.5-6 Stunden wurde als starke Protein-Protein-Interaktion interpretiert. Blaufärbungen, die nach 24 Stunden auftraten, wurden nicht mehr als positiv gewertet.

β -Galactosidase-Flüssigkulturassay

Eine semiquantitative Beurteilung der Interaktionsstärke erlaubte der Flüssigkulturassay. Dieser Test erfasst die Freisetzung von o-Nitrophenol ($\text{OD}_{420 \text{ nm}}$) aus o-Nitrophenylgalactopyranoside durch β -Galaktosidase aus Hefezellsaten. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde in "units" angegeben:

$$\beta\text{-Galactoidase units} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550}) \times \text{Vol (ml)} \times \text{OD}_{600}}{t \text{ (min)}}$$

Der Assay ist semi-quantitativ, da die β -Galaktosidaseaktivität auf die Hefezellzahl ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) bezogen wird. Klonale Unterschiede in den transaktivierenden Aktivitäten wurden berücksichtigt, indem jeweils drei verschiedene Hefeklone analysiert wurden. Daher repräsentieren die Fehlerbalken in Abb. 12 und 18 jeweils die Standardabweichungen aus Messungen mit drei verschiedenen Klonen ($n=3$), wobei die photometrischen Messungen einzelner Klone ebenfalls mit Dreifachwerten durchgeführt wurden.

5.5. Nachweis von PPI mit der "FarWestern"-Methode

5.5.1. Radioaktive Markierung

GST-Proteine wurden gegen 1xHMK-Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 12 mM MgCl_2) dialysiert und an Glutathionagarose gebunden (9 mg in 100 μ l). Die Phosphorylierung der Agarose-gebundenen GST-Fusionsproteine erfolgte mit 150 μ l Proteinkinase-Reaktionsansatz pro 100 μ l Gelbett (Ansatz: 15 μ l 10 x HMK, 5 μ l Rinderherzkinase in 40 mM DTT (10 U / ml), 5 μ l $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (ICN 3000 mCi / mMole), 125 ml Bidest). Der Proteinkinase-Reaktionsansatz wurde 20 min bei 30°C und 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 1 ml Stopp-Lösung (10 mM Na_2PO_4 (pH 8.0) 10 mM Na-Pyrophosphate, 10 mM EDTA pH 8.0, 1 mg/ ml BSA) beendet. Der Ansatz wurde 2 min zentrifugiert (500 x g). Anschließend wurde die freie Radioaktivität mit dem Überstand in 5 Waschschritten mit jeweils 5 ml 1 x PBS entfernt. Die phosphorylierten Fusionsanteile wurden mit Thrombin von dem Agarose-gebundenen GST-Protein getrennt und mit AC-Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 10% Glycerol, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1 % Tween 20) eluiert. Typische Markierungsexperimente erreichten 50×10^6 cpm bei 50 μ g GST-Fusionsprotein.

5.5.2. Renaturierung filtergebundener Proteine

recPA28-Proteine und GST-PA28/PI31 Fusionsproteine sowie B8-Fibroblastenlysate wurden in 1x Probenpuffer (20% Glycerol, 3% SDS, 0.01M Tris HCl pH 7, 0.05 % Bromphenolblau, 3% β -Mercaptoethanol) aufgenommen und im Minigelsystem (BIORAD) nach der Methode von Lämmli (1970) mittels **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)** aufgetrennt (Stocklösungen: 30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid ("rotiphoese Gel 30" ROTH); 4x Sammelgelpuffer: 250 mM Tris HCl pH 6.8, 0.8% SDS; 4x Trenngelpuffer: 150mM Tris HCl pH 8.8, 0.4% SDS; Elektrophoresepuffer: 25mM Tris, 190mM Glycin, 0.1% SDS; Standardansatz für 2 Minigele: 15%-iges Trenngel - 5.6ml Acrylamidlösung, 2.8ml 4x Trenngelpuffer, 2.8ml Bidest, 30ml 10% APS, 30ml TEMED; 4.5%-iges Sammelgel - 0.75ml Acrylamidlösung, 1.25ml 4xSammelgelpuffer, 1.75ml Bidest, 15ml 10% APS, 15ml TEMED). Die Elektrophorese erfolgte bei 50V-100 V. Im **Semidry-Verfahren** (BIOMETRA) wurden die Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosefilter (NC) transferiert (1h bei 50mA/Minigel; Anodenpuffer I: 0.3M Tris pH 10.4, 20% Methanol; Anodenpuffer II: 0.025M Tris pH 10.4, 20% Methanol; Kathodenpuffer: 5.5g/l Amino-N-Caprinsäure, 0.01% SDS, 20% Methanol).

Die NC-Filter wurden nach Ponceaufärbung der Proteine entweder sofort in Blocklösung inkubiert, oder einem **"Refolding"- Protokoll** unterzogen. Hierzu wurden die Filter sukzessive in AC- Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 10% Glycerol , 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1 % Tween 20) mit abnehmender Guanidinium-HCl-Konzentration inkubiert (6 M Guanidinium-HCl, 2% Milchpulver, 1 mM DTT, 30 min RT; 3 M Guanidinium-HCl, 2% Milchpulver, 30 min RT; 1 M Guanidinium-HCl, 2% Milchpulver, 30 min 4°C; 0.1 M Guanidinium-HCl, 2% Milchpulver, 30 min 4°C; AC-Puffer mit 2% Milchpulver, 1 mM DTT bei 4°C über Nacht).

5.5.3. "FarWestern"-Bindungsassay

Die geblockten NC-Filter (Minimum 1 Stunde in AC-Puffer mit 2% Milchpulver) wurden mit der radioaktiv markierten Probe in 20 ml AC-Puffer (+ 20 μ l 1M DTT + 25 μ g 32 P-markierten Proteins) 3 h bei 30 °C inkubiert und anschließend 2x mit AC-Puffer gewaschen. Es folgten weitere Waschschrte (1x mit AC-Puffer, 2 % Milchpulver , 1 mM DTT; 15 min 25 °C ; 3 x mit AC-Puffer, 15 min 4°C) . Die Filter wurden anschließend 10 min auf Filterpapier getrocknet (RT) . Dannach wurde ein Röntgenfilm (X-Omat AR5, KODAK) aufgelegt (Exposition 45 min - 5 d). Die Ergebnisse sind in Abb.17 B dargestellt.

5.6. Immunpräzipitationen und pulse-chase-Experimente

5.6.1. Basistechniken

A. Metabolische ^{35}S -Markierung und Immunpräzipitation von Proteinen

Konfluente Kulturen von B8-Zellen oder Transfektanten wurden 30 min in Methionin-freiem Medium (RPMI 1640 ohne Methionin) inkubiert und anschließend mit 100 μCi / ml ^{35}S -Methionin/Cystein (ICN; spez. Aktivität > 3000Ci / mmol) radioaktiv markiert. Nach der Markierung wurden die Zellen viermal mit PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) gewaschen und mit **Lysepuffer** (50 mM , pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1% NP40) von der Platte abgelöst. Unlösliche zelluläre Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt. 5 μl des Überstands wurden in 2 ml Scintillationslösung aufgenommen und zur **Bestimmung des radioaktiven Einbaus** in zelluläre Proteine 1 min im ^{35}S -Kanal gemessen. Der Überstand wurde dann für die Immunpräzipitation eingesetzt. Zur Vorbereitung der Protein-A-Sepharose wurden ca. 50 μl in 1 x PBS gequollen.

Die Hälfte der Protein A-Sepharose wurde mit 50 μl Präimmunserum versetzt, die andere Hälfte mit 50 μl des jeweiligen Antiserums. Die Bindung der Antikörper aus Präimmun- und Hyperimmunserum erfolgte während einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) unter Rotieren.

Danach wurde die Sepharose in Waschpuffer (10 mM Tris pH 7.2, 140 mM NaCl, Tris-Triton-0.05%) unter viermaligem Wechsel des Waschmediums aufgeschwemmt. Zur **Präadsorption** wurden die Zellysate mit der präimmunserumbehandelten Sepharose 2h bei RT unter Rotieren inkubiert, um zelluläre Proteine aus dem Lysat zu entfernen, die unspezifisch an die Protein-A-Sepharose oder an Antikörper des polyklonalen Kaninchenserums binden. Zur **Immunpräzipitation** wurde der Überstand aus der Präadsorption 2 h bei RT mit der Sepharose inkubiert, die mit dem Hyperimmunserum vorbehandelt worden war. Anschließend wurde das Protein-A-Sepharosesediment viermal in Hochsalzpuffer gewaschen (10 mM Tris pH 7.2, 280 mM-NaCl-Tris-Triton-0.05%).

Zur Analyse der Immunpräzipitate wurde die Sepharose entweder in 50 μl 2x-Probenpuffer aufgenommen und 3 min bei 95°C aufgeköcht oder über Nacht in 100 μl NEPHGE-Probenpuffer inkubiert. Überstände wurden auf 15%-ige SDS-PAGE Minigele oder auf 2D-NEPHGE-Gele aufgetragen [6]. SDS-PAGE-Gele wurden 30 min in Amplifier (Amersham) inkubiert und getrocknet. Es schloß sich eine Exposition mit einem Röntgenfilm an (Kodak X-Omat AR5).

5.6.2. Spezielle Verfahrensweisen

A. Immunpräzipitation von PA700-20S-PA28-Komplexen

B8-Fibroblasten wurden 5 h mit oder ohne IFN- γ (50 U/ ml) kultiviert (80% Konfluenz) und währenddessen in Methionin-freiem Medium metabolisch markiert (5 h "pulse"; 133 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$). Das Markierungsmedium wurde vor der 20-stündigen "chase"-Periode mit einem PBS-Waschschritt und nach der "chase"-Periode nochmals mit 2 PBS-Waschschritten entfernt. Die Zellen wurden trypsinisiert und nach einem weiteren Waschschritt in 1x PBS in

Lysepuffer 5 sec sonifiziert. Nach einer 12000 xg -Zentrifugation wurde der Überstand bei 37 °C inkubiert (30 min) und danach erneut zentrifugiert.

Die Lyse der B8-Fibroblasten erfolgte in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems (3ml Lysepuffer für 2 Ansätze: 25 mM Tris pH 7.5, 2.5 mM ATP, 2.5 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl , 17 % Glycerol, 1 mM DTT, 40 mM Phosphokreatin, 0.2 mg Kreatinkinase). Die Quantifizierung der radioaktiven Inkorporation ergab: B8= 95×10^6 cpm ; B8/ IFN- γ = 172×10^6 cpm.

Der p45-mAB (50 μ l) wurde an 200 μ l Protein-G-Sepharose (PHARMACIA) gebunden. Die Sepharose wurde nach Bindung des p45-mAB (4x) und nach 60-minütiger Inkubation mit dem Lysat (8x) mit Lysepuffer gewaschen. Die Immunpräzipitate wurden von der Sepharose über Nacht in 100 μ l NEPHGE-Probenpuffer abgelöst und auf 2D-NEPHGE-Gelen analysiert (Abb. 4).

B. Immunpräzipitation von PA28ab-Komplexen

Nach einstündiger metabolischer Markierung mit ^{35}S -Methionin wurde PA28 $\alpha\beta$ aus B8-Zellen und Transfektanten (3×10^7 Zellen) mit einem polyklonalen Kaninchenserum (K39.4) immunpräzipitiert, welches gegen die PA28 α -UE gerichtet ist. Hierzu wurden die Zellen in Lysispuffer (1 % Triton X 100 in PBS) aufgenommen und durch dreimalige Einfrier-Auftau-Zyklen lysiert. Die Lysate wurden auf 10-40%-igen Glycerolgradienten fraktioniert, wobei die aufgetragene Probenmenge auf der Basis des gemessenen Einbaus radioaktiver Aminosäuren (cpm) normiert wurde. Nach Zentrifugation (SW40, 40000 rpm, 18h) wurden die PA28-haltigen Fraktionen im Aktivitätsassay ermittelt und in Immunpräzipitationen eingesetzt. 300 μ l der aktiven Fraktionen wurden mit 5 μ g Affinitäts-gereinigtem K39.4-Antikörper (Soza, 1997; Dissertation) über Nacht bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Die Ansätze wurden mit 50 μ l gequollener Protein A-Sepharose (0,1 % Triton-X-100, 1 mg / ml Ovalbumin in PBS) 2 h bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Die Protein A-Sepharose wurde fünfmal mit Waschpuffer (0,1 % Triton-X-100 in 1x PBS) gewaschen. Die Sepharose wurde in 25 μ l 2x Probenpuffer aufgenommen und 10 min aufgekocht. Der Überstand wurde im Gradientengel separiert (Schägger & Jagow., 1987). Dieses Experiment (Abb. 5G) wurde von Dr. A. Soza im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt.

C. "pulse-chase"-Analyse der Stabilität von pp89

Die Stabilität des pp89-Proteins wurde im "pulse-chase"-Experiment durch Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper 6-58.1 (Keil et al., 1985) untersucht (Abb. 13 D). Der Lysepuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 % Triton X-100, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM PMSF, 6,6 μ g / ml Aprotinin, 5 μ g / ml Leupeptin) enthielt eine erhöhte Triton-X100 Konzentration, um einen Aufschluß der Zellkerne sicherzustellen. Der Zell- und Kernaufschluß erfolgte innerhalb einer einstündigen Inkubation auf Eis in 200 μ l Lysepuffer. Im Übrigen wurde nach dem Standardprotokoll (5.6.1) verfahren. Es wurden jeweils 5×10^5 cpm eingesetzt. Die pulse-chase-Bedingungen waren jeweils 1h "pulse" und 0, 1,3,8 h "chase". Die im 2x-Probenpuffer gelösten Proteine des Immunpräzipitats wurden auf einem 8 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Expositionszeit des Autoradiogramms betrug 5 Tage.

D. "pulse-chase"-Analyse der Stabilität von PA28g

Die Stabilität des PA28 γ -Proteins wurde in "pulse-chase"-Experimenten ermittelt (Abb. 16). Zur Immunpräzipitation mit dem polyklonalen Kaninchen-Serum K58.4 wurde das Standardverfahren (5.6.1.) verwendet.

5.7. Etablierung von B8-mPA28g-Transfektanten

5.7.1. Kultivierung von B8-Fibroblasten und B8-Transfektanten

Die B8-Zelllinie wurde von der AG Koszinowski (Universität München) aus der C4-Fibroblasten-Zelllinie durch stabile Transfektion eines eukaryontischen pp89-Expressionskonstruktes und des G418-Resistenzgens etabliert. Die B8-Zelllinie ist als MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsmodell geeignet, da die Prozessierung des pp89-Proteins zum immundominanten Nonamerepitop im CTL-Assay quantifiziert werden kann.

B8-Zellen wurden in basalem ISCOVE-Medium, welches mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin und den Antibiotika Penicillin/Streptomycin supplementiert wurde, in Petrischalen bei 37 °C, 5% CO₂ und wassergesättigter Luft gehalten (Zellinkubator (Heraeus)). Das Medium enthielt 400 µg / ml G418 (Genitacin, GIBCO), um die Selektion auf pp89-Expression zu gewährleisten. Zur Konservierung von Zelllinien wurden die Zellen in Einfriermedium (Vollmedium + 20% FCS + 10 % DMSO) langsam eingefroren und unter flüssigem Stickstoff gelagert.

5.7.2. Transfektion von Calciumphosphat-DNA-Präzipitaten in B8-Zellen

Das eukaryontische Expressionskonstrukt pSG5-mPA28 γ (8 µg) wurde mit dem Restriktionsenzym Asp700 im Amp-Resistenzgen linearisiert und zusammen mit dem BamHI geschnittenen Resistenzplasmid pLXSP (2 µg) in Ethanol gefällt. Die sterile, getrocknete DNA wurde in 400 µl sterilem H₂O gelöst und mit 62 µl 2 M CaCl₂ gemischt. 500 µl 2x HBS (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM Glucose, 50 mM HEPES pH 7,05) wurden innerhalb von einer Minute zu dem Transfektionsansatz unter langsamen Schütteln zugetropft. Der gesamte Ansatz wurde 30 min bei RT inkubiert und dann zu 5x10⁶ B8 Zellen pipettiert. Die Aufnahme des Präzipitats wurde nach 5 h durch eine Glycerinschockbehandlung verstärkt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und durch eine sterile 2%ige Glycerinlösung in 1 xPBS ersetzt. Nach 2 min wurde dieses Medium erneut abgesaugt und durch Vollmedium ersetzt. Nach 24 h wurden die Zellen unter Selektionsmedium gesetzt (Vollmedium + Hygromycin (80 µl einer 50 mg/ml Stocklösung pro 10 ml Medium)) und in verschiedenen Verdünnungen (10⁴ Zellen/Loch, 10³ Zellen/Loch und 10² Zellen/Loch) in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausplattiert. Zwischen der zweiten und vierten Kultivierungswoche wurden zahlreiche Hygromycin-resistente Klone selektioniert. Die Gegenwart des pSG5-mPA28 γ -Expressionsvektors in resistenten Klonen wurde mittels PCR geprüft. Positive Klone wurden durch Einfrieren gesichert. Die Überexpression von mPA28 γ in B8-Zellklonen wurde in Westernblotanalysen verifiziert (Abb. 13A).

5.7.3. Durchflußzytometrische Analyse der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression

Konfluente B8-Zellen/-Transfektanten wurden trypsinisiert. Zellen aus 10-cm-Ø-Petrischalen wurden in 3 ml Medium resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 450xg (10 min bei 4 °C) wurde das Zellsediment in PBS aufgenommen (1×10^6 Zellen/ml). Je 200 µl der Zellsuspension (1×10^5 Zellen) wurden in eine 96 Loch-Mikrotiterplatte (mit rundem Boden) ausplattiert und 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 100 µl der entsprechenden Antikörperlösung aufgenommen (Ozato et al. 1980a; 1980b; [H-2L^d; 28-14-91; 1:250] [H-2D^d; 10-71-91; 1:250] [H-2K^d; 15-5-55; 1:10] in 0.5 % BSA in 1 x PBS), geschüttelt und auf Eis 15 min inkubiert. Dann wurden die Zellen 2 min zentrifugiert und dreimal mit BSA/PBS-Puffer (1 x PBS, 0.5 % BSA, 0.02% NaN₃) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 30 min auf Eis mit dem FITC-markierten Antikörper (FITC-conjugated, affinity pure F(ab)₂-goat-anti-mouse-IgG, DIANOVA) inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal mit BSA/PBS-Puffer gewaschen. Die Messung der MHC-Klasse -I- Moleküle erfolgte mittels FACSCALIBUR (Becton Dickinson, Heidelberg).

5.7.4. Cytotoxischer-T-Lymphozyten-Test

Die in dieser Arbeit aufgeführten Cytotoxischen-T-Lymphozyten (CTLs) -Analysen wurden von Dr. Maren Eggers und Dipl. Biol. Ulrike Salzmann nach dem Verfahren von Del Val et al. (1989) durchgeführt.

Der CTL-Test erfaßt die Effizienz der Antigenpräsentation, indem das Verhältnis der Effektorzellen zu den Zielzellen gemessen wird, die benötigt werden, einen bestimmten Lysegrad der Zielzellen zu erreichen. Die Zielzellen wurden mit ⁵¹Chrom markiert und anschließend zusammen mit cytolytischen T-Lymphozyten (CTL) inkubiert. H-2L^d-restringierte, spezifische polyklonale CTL wurden in vitro durch Restimulation von Milzzellen mit dem pp89-Nonamer YPHFMPTNL in Gegenwart von IL-2 erhalten.

Ca. 5×10^5 Targetzellen wurden 1-1,5 Stunden mit 100 µCi Na⁵¹CrO₄ markiert und anschließend dreimal mit Vollmedium gewaschen. Jeweils 1000 markierte Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte (96 Loch-Platte) zu den titrierten Effektorzellen (CTL) hinzugegeben. Um die räumliche Nähe von CTL und Targetzellen zu gewährleisten, wurde die Platte 2 min bei 200xg zentrifugiert und anschließend für 4-6 h bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Kulturüberstand abgenommen und die freigesetzte Radioaktivität bestimmt. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität wurden die Targetzellen resuspendiert und die Radioaktivität ebenfalls in 100 µl bestimmt. Die Spontanlyse stellt die freigesetzte Radioaktivität (in 100 µl) in Abwesenheit der CTL dar. Die spezifische Lyse berechnet sich nach der Gleichung (5.1):

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = \frac{\text{cpm (Probe)} - \text{cpm (Spontanlyse)}}{\text{cpm (Gesamtaktivität)} - \text{cpm (Spontanlyse)}}$$

6.1. Eigenzitate

- [1] **Stohwasser, R. and Kloetzel, P.-M. (1996).** Cytokine induced changes in proteasome subunit composition are concentration dependent. **Biol. Chemistry 377: 571-577.**
- [2] Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., **Stohwasser, R., Kloetzel, P. (1996).** A third interferon- γ -induced subunit exchange in the 20S-Proteasome.
Eur. J. Immunol. 26: 863-869.
- [3] **Stohwasser, R., Standera, S., Peters, I., Kloetzel, P.-M., Groettrup, M. (1997).** Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon- γ -modulated proteasome subunits.
Eur. J. Immunol. 27: 1182-1187.
- [4] Groettrup, M., Standera, S., **Stohwasser, R., Kloetzel, P.-M. (1997).** The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S-Proteasome.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 8970-8975.
- [5] **Stohwasser, R., Kuckelkorn, U., Kraft, R., Kostka, S., and Kloetzel, P.-M. (1996).** 20S-Proteasome from LMP7 knock out mice reveals altered proteolytic activities and cleavage site preferences. **FEBS Lett. 383: 109-113.**
- [6] **Stohwasser, R., Giesebrecht, J., Kraft, R., Müller, E.C., Husler, G., Kettenmann, H., Hanisch, U.K., and Kloetzel, P.K. (1999).** Biochemical Analysis of Proteasomes from Mouse Microglia: Induction of Immunoproteasomes by Interferon- γ and Lipopolysaccharide.
Glia, im Druck
- [7] Kloetzel, P.-M., Soza, A. and **Stohwasser, R. (1999).** The role of the proteasome system and the proteasome activator PA28 complex in the cellular immune response.
Biol Chem. 380: 293-297.

Teile der in 3. Ergebnisse B vorgestellten Daten sind zur Publikation eingereicht:

Stohwasser, R., Soza, A., Eggers, M., Koszinowski, U., and Kloetzel, P.M. (1999).

PA28 $\alpha\beta$ double and PA28 β single transfectant mouse B8 cell lines reveal enhanced presentation of mouse cytomegalovirus (MCMV) pp89 MHC class I epitope. **Molecular Immunology**, eingereicht

6.2. Vollständige Literaturübersicht

- Adams, G. M., Falke, S., Goldberg, A. L., Slaughter, C. A., DeMartino, G. N., Gogol, E. P.** (1997). Structural and functional effects of PA700 and modulator protein on proteasomes. *J. Mol. Biol.* 273, 646-657.
- Adams, J., Palombella, V. J., Sausville, E. A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D. D., Maas, J., Pien, C. S., Prakash, S., and Elliott, P. J.** (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 59, 2615-2622.
- Ahn, J. Y., Tanahashi, N., Akiyama, K., Hisamatsu, H., Noda, C., Tanaka, K., Chung, C. H., Shibmara, N., Willy, P. J., Mott, J. D., and et al.** (1995). Primary structures of two homologous subunits of PA28, a gamma-interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett* 366, 37-42.
- Ahn, K., Erlander, M., Leturcq, D., Peterson, P. A., Fruh, K., and Yang, Y.** (1996a). In vivo characterization of the proteasome regulator PA28. *J. Biol. Chem.* 271, 18237-18242.
- Ahn, K., Meyer, T. H., Uebel, S., Sempe, P., Djaballah, H., Yang, Y., Peterson, P. A., Früh, K., and Tampe, R.** (1996b). Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus protein ICP47. *EMBO J.* 15, 3247-3255.
- Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T. R., Wiertz, E. J. H. J., Ploegh, H. L., Peterson, P. A., Yang, Y., and Früh, K.** (1997). The ER-luminal domain of HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* 6, 613-621.
- Akaishi, T., Shiomi, T., Sawada, H., and Yokosawa, H.** (1996a). Purification and properties of the 26S proteasome from the rat brain: Evidence for its degradation of myelin basic protein in a ubiquitin-dependent manner. *Brain Research* 722, 139-144.
- Akaishi, T., Sawada, H., and Yokosawa, H.** (1996b). Properties of 26S proteasome purified from rat skeletal muscles: comparison with those of 26S proteasome from the rat brain. *Biochemistry and Molecular Biology International* 39, 1017-1021.
- Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A.** (1994). Interferon- γ induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J. Biochem.* 115, 257-269.
- Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Shimbara, N., Takashina, M., Kristensen, P., Hendil, K. B., Tanaka, K., and Ichihara, A.** (1994a). Replacement of proteasome subunits X and Y by LMP7 and LMP2 induced by interferon- γ for aquirement of the functional diversity responsible for antigen processing. *FEBS Lett.* 343, 85-88.
- Akiyama, K.-y., Yokota, K.-y., Kagawa, S., Shimbara, N., Tamura, T., Akioka, H., Nothwang, H. G., Noda, C., Tanaka, K., and Ichihara, A.** (1994b). cDNA cloning and interferon γ down-regulation of proteasomal subunits X and Y. *Science* 265, 1231-1234.
- Albertsen, H. M., Smith, S. A., Mazoyer, S. S., Fujimoto, E., Stevens, J., Williams, B., Rodriguez, P., Cropp, C. S., Slijepcevic, P., Carlson, M., and Robertson, M.** (1994). A physical map and candidate genes in the BRCA1 region on chromosome 17q12-21. *Nature Genet.* 7, 472-479.
- Aloisi, F., Ria, F., Penna, G., Adorini, L.** (1998). Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J. Immunol.* 160, 4671-4680.
- Antón, L. C., Snyder, H. L., Bennink, J. R., Vinitsky, A., Orlowski, M., Porgador, A., and Yewdell, J. W.** (1998). Dissociation of proteasomal degradation of biosynthesized viral proteins from generation of MHC class I-associated antigenic peptides. *J. Immunol.* 160, 4859-4868.
- Antón, L. C., Schubert, U., Bacik, I., Princiotta, M. F., Wearsch, P. A., Gibbs, J., Day, P. M., Realini, C., Rechsteiner, M. C., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W.** (1999). Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J. Cell Biol.* 146, 113-124.
- Aravind, L., and Ponting, C. P.** (1998). Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci.* 7, 1250-1254.

- Aschner, M.** (1998). Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. *Toxicol Lett* 102-103, 283-287.
- Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R., and Fields, S.** (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14, 920-924.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E.** (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-80.
- Biederer, T., Volkwein, C., and Sommer, T.** (1996). Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 15, 2069-2076.
- Biederer, T., Volkwein, C., and Sommer, T.** (1997). Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* 278, 1806-1808.
- Bocchini, V., Mazzolla, R., Barluzzi, R., Blasi, E., Sick, P., and Kettenmann, H.** (1992). An immortalized cell line expresses properties of activated microglia. *J. Neurosci. Res.* 31, 616-621.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C., and Huber, R.** (1999). The proteasome [In Process Citation]. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* 28, 295-317.
- Boes, B., Hengel, H., Ruppert, T., Multhaup, G., Koszinowski, U. H., and Kloetzel, P. M.** (1994). Interferon γ stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J. Exp. Med.* 179, 901-909.
- Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.-M., Finley, D., and Schmidt, M.** (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nature Cell Biol.* 1, 221-226.
- Brown, M. G., Driscoll, J., and Monaco, J. J.** (1991). Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 353, 355-357.
- Brown, M. G., Driscoll, J., and Monaco, J. J.** (1993). MHC-linked low-molecular mass polypeptide subunits define distinct subsets of proteasomes: Implications for divergent function among distinct proteasome subsets. *J. Immunol.* 151, 1193-1204.
- Carson, M. J., Reilly, C. R., Sutcliffe, J. G., and Lo, D.** (1998). Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* 22, 72-85.
- Cash, E. and Rott, O.** (1994). Microglial cells qualify as the stimulators of unprimed CD4+ and CD8+ T lymphocytes in the central nervous system. *Clin. Exp. Immunol* 98, 313-318.
- Castano, J. G., Mahillo, E., Arizti, P., and Arribas, J.** (1996). Phosphorylation of C8 and C9 subunits of the multicatalytic proteinase by casein kinase II and identification of the C8 phosphorylation sites by direct mutagenesis. *Biochemistry* 35, 3782-3789.
- Chu-Ping, M., Slaughter C.A. and DeMartino G.N.** (1992a). Identification, purification and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S Proteasome (Macropain).
- Chu-Ping, M., Slaughter, C. A., and DeMartino, G. N.** (1992b). Purification and characterization of a protein inhibitor of the 20S proteasome (macropain). *Biochim Biophys Acta* 1119, 303-311.
- Chu-Ping, M., Willy, P. J., Slaughter, C. A., and DeMartino, G. N.** (1993). PA28, an activator of the 20 S proteasome, is inactivated by proteolytic modification at its carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* 268, 22514-22519.
- Chu-Ping, M., Vu J.H., Proske R.J., Slaughter C.A. and DeMartino G.N.** (1994). Identification, purification, and Characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 269, 3539.
- Chung, M. K., Yoon, H., Min, S. F., Lee, H. G., Kim, Y. J., Lee, T. G., Lim, J. S., Kim, C. M., and Park, S. N.** (1999). Induction of cytotoxic T lymphocytes with peptides in vitro: identification of candidate T cell epitopes in hepatitis B virus X antigen. *Immunotherapie* 22, 279-287.
- Ciechanover, A., and Schwartz, A. L.** (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2727-2730.

- Conconi, M., Djavadi-Ohanian, L., Uerkvitz, W., Hendil, K. B., and Friguet, B. (1999).** Conformational changes in the 20S-Proteasome upon macromolecular ligand binding analyzed with monoclonal antibodies. *Arch Biochem Biophys* 362, 325-8.
Curr. Biol. 5, 923-930.
- Dahlmann, B., Kuehn, L., Rutschmann, M., and Reinauer, H. (1985).** Purification and characterization of a multicatalytic high molecular mass proteinase from skeletal muscle. *Biochem. J.* 228, 161-170.
- Dahlmann, B., Kopp, F., Kristensen, P., and Hendil, K. B. (1999).** Identical subunit topographies of human and yeast 20S-Proteasomes. *Arch Biochem Biophys* 363, 296-300.
- Dandri, M., Schirmacher, P., and Rogler, C. (1996).** Woodchuck hepatitis virus X protein is present in chronically infected woodchuck liver and woodchuck hepatocellular carcinomas which are permissive for viral replication. *J. Virol.* 70, 5246-5254.
- Del Val, M., Volkmer, H., Rothbard, J. B., Jonjic, S., Messerle, M., Schickedanz, J., Reddehase, M. J., and Koszinowski, U. (1988).** Molecular basis for cytolytic T-lymphocyte recognition of the murine cytomegalovirus immediate-early protein pp89. *J. Virol.* 62, 3965-3972.
- Del Val, M., Münch, K., Reddehase, M. J., and Koszinowski, U. H. (1989).** Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. *Cell* 58, 305-315.
- Del Val, M., Schlicht H.J., Ruppert T., Reddehase M.J., and Koszinowski U.H. (1991).** Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell* 66, 1145.
- Deveraux, Q., Nocker, S. v., Mahaffey, D., Vierstra, R., and Rechsteiner, M. (1995).** Inhibition of ubiquitin-mediated proteolysis by the Arabidopsis 26S protease subunit S5a. *J. Biol. Chem.* 270, 29660-29663.
- Dick, T.P., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P.M., Kuehn, L., Koszinowski, U.H., Stevanovic, S., Schild, H. and Rammensee, H.-G. (1996).** Coordinated dual cleavages by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86, 253-262.
- Draheim, H., Prinz, M., Weber, J.R., Weiser, T., Kettenmann, H., and Hanisch, U.K. (1999).** Induction of K⁺ channels in mouse brain microglia: Cells acquire responsiveness to pneumococcal cell wall components during late development. *Neuroscience* 89, 1379-1390.
- Driscoll, J., Brown, M. G., Finley, D., and Monaco, J. J. (1993).** MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* 365, 262-264.
- Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., and Rechsteiner, M. (1992).** Purification of an 11S regulator of the multicatalytic proteinase. *J. Biol. Chem.* 267, 22369-22377.
- Dubiel, W., Ferrel, K., and Rechsteiner, M. (1995).** Subunits of the regulatory complex of the 26 S protease. *Mol. Biol. Rep.* 21, 27-34.
- Ehrlich, R. (1995).** Selective mechanisms utilized by persistent and oncogenic viruses to interfere with antigen processing and presentation. *Immunol. Res.* 14, 77-97.
- Elenich, L. A., Nandi, D., Kent, A. E., McCluskey, T. S., Cruz, M., Lyer, M. N., Woodward, E. C., Conn, C. W., Ochoa, A. L., Ginsburg, D. B., and Monaco, J. J. (1999).** The complete primary structure of mouse 20S-Proteasomes. *Immunogenetics* 49, 835-842.
- Fehling, H.J., Swat, W., Laplace, C., Kuehn, R., Rajewsky, K., Mueller, U. and von Boehmer, H. (1994).** MHC class I expression in mice lacking proteasome subunit LMP-7. *Science* 265, 1234-1237.
- Fine, S. M., Maggirwar, S. B., Elliott, P. R., Epstein, L. G., Gelbard, H. A., and Dewhurst, S. (1999).** Proteasome blockers inhibit TNF-alpha release by lipopolysaccharide stimulated macrophages and microglia: implications for HIV-1 dementia. *J Neuroimmunol* 95, 55-64.

- Fischer**, H. G., and Eder, C. (1995). Voltage-gated K⁺ currents of mouse dendritic cells .FEBS Lett 373, 127-130.
- Fischer**, M., Hilt, W., Richter-Ruoff, B., Gonen, H., Ciechanover, A., and Wolf, D. H. (1994). The 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 355, 69-75.
- Fischer**, M., Runkel, L., and Schaller, H. (1995). HBx protein of Hepatitis B Virus interacts with the C-terminal portion of a novel human proteasome alpha subunit. Virus Genes 10, 99-102.
- Ford**, A. L., Goodsall, A. L., Hickey, W. F., and Sedgwick, J. D. (1995). Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4⁺ T cells compared. J Immunol 154, 4309-4321.
- Frei**, K., Siepl, C., Groscurth, P., Bodmer, S., Schwerdel, C. and Fontana, A. (1987). Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon- γ -treated microglial cells. Eur. J. Immunol. 17, 1271-1278.
- Frentzel**, S., Kuhn, H. I., Gernold, M., Gött, P., Seelig, A., and Kloetzel, P. M. (1993). The major histocompatibility-complex-encoded beta-type proteasome subunits LMP2 and LMP7--Evidence that LMP2 and LMP7 are synthesized as proproteins and that cellular levels of both mRNA and LMP-containing 20S proteasomes are differentially regulated. Eur. J. Biochem. 216, 119-126.
- Früh**, K., Gossen, M., Wang, K., Bujard, H., Peterson, P. A., and Yang, Y. (1994). Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. EMBO J. 13, 3236-3244.
- Fujita**, K., Omura, S., and Silver, J. (1997). Rapid degradation of CD4 in cells expressing human immunodeficiency virus type 1 Env and Vpu is blocked by proteasome inhibitors. J. Gen. Virol. 78, 619-625.
- Gaczynska**, M., Rock, K. L., and Goldberg, A. L. (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. Nature 365, 264-267.
- Gaczynska**, M., Rock, K. L., Spies, T., and Goldberg, A. L. (1994). Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP 2 and LMP 7. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9213-9217.
- Gaczynska**, M., Goldberg, A. L., Tanaka, K., Hendil, K. B., and Rock, K. L. (1996). Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon- γ -induced subunits LMP2 and LMP7. J. Biol. Chem. 271, 17275-17280.
- Gehrmann**, J., Matsumoto, Y. and Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. Brain Res. Rev. 20: 269-287.
- Geier**, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K., and Niedermann, G. (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. Science 283, 978-981.
- Glickman**, M. H., Rubin, D. M., Fried, V. A. and Finley, D. (1998a) The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. Mol. Cell Biol. 18, 3149-3162.
- Glickman**, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A., Finley, D. (1998b). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. Cell 94: 615-623.
- Glynne**, R., Powis, S. H., Beck, S., Kelly, A., Kerr, L. A., Trowsdale, J. 1991. A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. Nature 353, 357-360.
- Groettrup**, M., Ruppert, T., Kuehn, L., Seeger, M., Standera, S., Koszinowski, U., and Kloetzel, P. M. (1995). The interferon-gamma-inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro. J. Biol. Chem. 270, 23808-23815.
- Groettrup**, M., Soza, A., Kuckelkorn, U. and Kloetzel, P.-M. (1996a) Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. Immunol. Today 17, 429-435.

- Groettrup**, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T.P., Schild, H., Rammensee, H.-G., Koszinowski, U.H. and Kloetzel, P.-M. (1996b). A role for the proteasome regulator PA28 α in antigen presentation. *Nature*, 381, 166-168.
- Groettrup**, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R. and Kloetzel, P.-M. (1996c). A third interferon- γ -induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur. J. Immunol.* 26, 863-869.
- Groettrup**, M., Standera, S., Stohwasser, R. and Kloetzel, P.M. (1997). The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8970-8975.
- Groettrup**, M., and Schmidtke, G. (1999). Selective proteasome inhibitors: modulators of antigen presentation? *Drug Discovery Today* 4, 63-71.
- Groll**, M., Ditzel, L., Löwe, J., Satock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. (1997) Structure of 20 S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature*, 386, 463-471.
- Guidotti**, L. G., Ando, K., Hobbs, M., Ishikawa, T., Runkel, L., Schreiber, R., and Chisari, F. V. (1994). Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3764-3768.
- Havenith**, C.E., D. Askew, and Walker, W.S. (1998) Mouse resident microglia: isolation and characterization of immunoregulatory properties with naive CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. *Glia* 22, 348-359.
- Hayashi**, M., Ishibashi, T., Tanaka, K., and Kasahara, M. (1997). The mouse genes encoding the third pair of b-type proteasome subunits regulated reciprocally by IFN- γ . *J. Immunol.* 159, 2760-2770.
- Heinemeyer**, W., Kleinschmidt, J. A., Saidowsky, J., Escher, C., and Wolf, D. H. (1991). Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis und uncover its necessity for cell survival. *EMBO J.* 10, 555-562.
- Heinemeyer**, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., and Wolf, D. H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20S proteasome and their involvement in subunit processing. *J. Biol. Chem.* 272, 25200-25209.
- Hendil**, K.B., Khan, S. and Tanaka, K. (1998) Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J*, 332: 749-754.
- Hershko**, A., and Ciechanover, A. (1998). The Ubiquitin System. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479.
- Hiller**, M.M., Finger, A., Schweiger, M. and Wolf, D.H. (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1725-1728.
- Hisamatsu**, H., Shimbara, N., Saito, Y., Kristensen, P., Hendil, K. B., Fujiwara, T., Takahashi, E., Tanahashi, N., Tamura, T., Ichihara, A., and Tanaka, K. (1996). Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon- γ . *J. Exp. Med.* 183, 1-10.
- Holzthütter**, H. G., Frommel, C., and Kloetzel, P. M. (1999). A theoretical approach towards the identification of cleavage- determining amino acid motifs of the 20 S proteasome. *J Mol Biol* 286, 1251-1265.
- Horikoshi**, T., Page, J., Lei, G., Brysk, H., Arany, I., Tying, S. K., and Brysk, M. M. (1998). Proteasomal RNase activity in human epidermis. *In Vivo* 12, 155-158.
- Homma**, S., Horsch, A., Pouch, M.-N., Petit, F., Briand, Y., and Schmid, H.-P. (1994). Proteasomes (prosome) inhibit the translation of Tobacco mosaic virus RNA by preventing the formation of initiation complexes. *Mol. Biol. Rep.* 20, 57-61.
- Horsch**, A., Martins de Sa, C., Dineva, B., Spindler, E., Schmidt, H-P. (1989). Prosome discriminate between mRNA of adenovirus infected and uninfected HeLa cells. *FEBS Lett.* 246, 131-136.
- Hu**, Z., Zhang, Z., Doo, E., Coux, O., Goldberg, A. L., and Liang, T. J. (1999). Hepatitis B Virus X Protein Is both a Substrate and a Potential Inhibitor of the Proteasome Complex. *J Virol* 73, 7231-7240.
- Huang**, J., Kwong, J., Sun, E. C.-Y., and Liang, T. J. (1996). Proteasome complex as a potential cellular target of Hepatitis B virus X protein. *J. Virol.* 70, 5582-5591.

- Jarrousse**, A. S., Petit, F., Kreutzer-Schmid, C., Gaedigk, R., and Schmid, H. P. (1999a). Possible involvement of proteasomes (prosome) in AUUUA-mediated mRNA decay. *J. Biol. Chem.* 274, 5925-5930.
- Jarrousse**, A. S., Gautier, K., Apcher, S., Badaoui, S., Boissonnet, G., Dadet, M. H., Henry, L., Bureau, J. P., Schmid, H. P., and Petit, F. (1999b). Relationships between proteasomes and viral gene products. *Mol Biol Rep* 26, 113-117.
- Johnston** S.C., Whitby F.G., Realini C., Rechsteiner M. and Hill C.P. (1997). The proteasome 11S regulator subunit REG α (PA28 α) is a heptamer. *Protein Science* 6, 2469.
- Jorgensen**, L., and Hendil, K. B. (1999). Proteasome subunit zeta, a putative ribonuclease, is also found as a free monomer. *Mol Biol Rep* 26, 119-123.
- Kalchman**, M. A., Graham, R. K., Xia, G., Koide, H. B., Hodgson, J. G., Graham, K. C., Goldberg, Y. P., Gietz, R. D., Pickart, C. M., and Hayden, M. R. (1996). Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J. Biol. Chem.* 271, 19385-19394.
- Kandil**, E., Kohda, K., Ishibashi, T., Tanaka, K. and Kasahara, M. (1997). PA28 subunits of the mouse proteasome: primary structures and chromosomal localization of the genes
- Kania** M.A., DeMartino G.N., Baumeister W. and Goldberg A.L. (1996). The proteasome subunit, C2, contains an important site for binding of the PA28 (11S) activator.
- Keil**, G. M., Fibl, M. R., and Koszinowski, U. (1985). Characterization of the major immediate early polypeptides encoded by murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 54, 422-428.
- Kelly**, A., Powis, S. H., Glynn, R., Radley, E., Beck, S., Trowsdale, J. 1991. Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 353:667-668.
- Kettenmann**, H., Banati, R., and Walz, W. (1993). Electrophysiological behavior of microglia. *Glia* 7, 93-101.
- Kisselev**, A. F., Akopian, T. N., Castillo, V., and Goldberg, A. L. (1999a). Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Molec. Cell* 4, 395-402.
- Kleinschmidt**, J. A., Hügler, B., Grund, C., and Franke, W.W. (1983). The 22S cylinder particles of *Xenopus laevis*. I. Biochemical and electron microscopic characterization. *Eur. J. Cell Biol.* 32, 143-156.
- Kloetzel**, P.-M. (1987). 19S cylinder scRNP particles ubiquitous from plants to man: Their morphology, molecular composition and their function. *Mol. Biol. Rep.*, 223-227.
- Kloetzel**, P.M. Soza, A., and Stohwasser, R., (1999) The role of the proteasome system and the proteasome activator PA28 complex in the cellular immune response. *Biol. Chem.* 380, 293-297.
- Knowlton**, J. R., Johnston, S. C., Whitby, F. G., Realini, C., Zhang, Z., Rechsteiner, M., and Hill, C. P. (1997). Structure of the proteasome activator REG α (PA28 α). *Nature* 390, 639-643.
- Kolson**, D.L., Lavi, E. and Gonzalez-Scarano, F. (1998) The effects of human immunodeficiency virus in the central nervous system. *Adv. Virus Res.* 50, 1-47.
- Kovacsovics-Bankowski**, M., and Rock, K. L. (1994). Presentation of exogenous antigens by macrophages: analysis of major histocompatibility complex class I and II presentation and regulation by cytokines. *Eur. J. Immunol.* 24, 2421-2428.
- Kovacsovics-Bankowski**, M., and Rock, K.L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243-246.
- Kuckelkorn**, U., Frenz, S., Kraft, R., Kostka, S., Groettrup, M., and Kloetzel, P.-M. (1995). Incorporation of major histocompatibility complex - encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon- γ . *Eur. J. Immunol.* 25, 2605-2611.
- Kuehn**, L., and Dahmann, B. (1996a). Proteasome activator PA28 and its interaction with 20 S proteasomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 329, 87-96.
- Kuehn**, L., and Dahmann, B. (1996b). Reconstitution of proteasome activator PA28 from isolated subunits: optimal activity is associated with an α , β -heteromultimer. *FEBS Lett* 394, 183-186.

- Lämmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., and Schneider, R. J.** (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 284, 499-502.
- Larsen, F., Solheim, J., Kristensen, T., Kolsto, A.-B., and Prydz, H.** (1993). A tight cluster of five unrelated human genes on chromosome 16q22.1. *Human Mol. Gen.* 2, 1589-1595.
- Lin, L., DeMartino, G. N., and Green, W. C.** (1998). Cotranslational Biogenesis of NFkB p50 by the 26S proteasome. *Cell* 92, 819- 828.
- Luckey, C. J., King, G. M., Marto, J. A., Venketeswaran, S., Maier, B. F., Crotzer, V. L., Colella, T. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H.** (1998). Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol. *J. Immunol.* 161, 112-21.
- Ma, C. P., Willy, P. J., Slaughter, C. A., and DeMartino, G. N.** (1993). PA28, an activator of the 20 S proteasome, is inactivated by proteolytic modification at its carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* 268, 22514-22519.
- Maksymowych, W. P., and Russell, A. S.** (1994). Polymorphism in the LMP2 gene influences the relative risk for acute anterior uveitis in unselected patients with ankylosing spondylitis. *Clin. Invest. Med.* 18, 42-46.
- Maniatis T., Fritsch E.F., and Sambrook J.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Martinez, C. K., Monaco, J. J.** 1991. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature* 353:664-667.
- Mason, G. G., Murray, R. Z., Pappin, D., and Rivett, A. J.** (1998). Phosphorylation of ATPase subunits of the 26S proteasome. *FEBS Lett* 430, 269-74.
- McCarthy, M., He, J. and Wood, C.** (1998) HIV-1 strain-associated variability in infection of primary neuroglia. *J. Neurovirol.* 4, 80-89.
- McGuire, M. J., and DeMartino, G. N.** (1986). Purification and characterization of a high molecular weight proteinase (macropain) from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 873, 279-89.
- McGuire, M. J., and DeMartino, G. N.** (1989). The latent form of macropain (high molecular weight multicatalytic protease) restores ATP-dependent proteolysis to soluble extracts of BHK fibroblasts pretreated with anti-macropain antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 911-916.
- Missale, G., Redeker, A., Person, J., Guilhot, S., Schlicht, H. J., Ferrari, C., and Chisari, F. V.** (1993). HLA-A31 and HLA-Aw68 restricted cytotoxic T cell response to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitop during acute viral hepatitis. *J. Exp. Med.* 177, 751-762.
- Morioka, T., Kalehua, A. N., and Streit, W. J.** (1992). Progressive expression of immunomolecules on microglial cells in rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol Berl* 83, 149-157.
- Mykles, D. L.** (1998). Intracellular proteinases of invertebrates: calcium-dependent and proteasome/ubiquitin-dependent systems. *International Review of Cytology* 184, 157-289.
- Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D.B. and Monaco, J.J.** (1997) Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor β subunits. *EMBO J.* 16, 5363-5375.
- Nayersina, R., Fowler, P., Guilhot, S., Missale, G., Cerny, A., Schlicht, H. J., Vitiello, A., Chesnut, R., Person, J. L., Redeker, A. G., and Chisari, F. V.** (1993). HLA2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J. Immunol.* 150, 4659-4671.

- Ni, R., Tomita, Y., Tokunaga, F., Liang, T. J., Noda, C., Ichihara, A., and Tanaka, K. (1995).** Molecular cloning of two types of cDNA encoding subunit RC6-I of rat proteasomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1264, 45-52.
- Nikaido, T., Shimada, K., Nishida, Y., Lee, R. S., Pardee, A. B., and Nishizuka, Y. (1989).** Loss in transformed cells of cell cycle regulation of expression of a nuclear protein recognized by SLE patient antisera. *Exp. Cell Res.* 182, 284.
- Nikaido T., Shimada K., Shibata M., Hata M., Sakamoto M., Y.Takasaki, Sato C., Takahashi T. and Nishida Y. (1990).** Cloning and nucleotide sequence of cDNA for Ki antigen, a highly conserved nuclear protein detected with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 79, 209.
- Ortiz, N. V., Seelig, A., Gernold, M., Frentzel, S., Kloetzel, P. M., Hämmerling, G. J. 1991.** Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353, 662-664
- Ozato, K., Mayer, N., and Sachs, D. N. (1980a).** Hybridoma cell clones secreting monoclonal antibodies to mouse H-2Ia antigens. *J. Immunol.* 124, 533-540.
- Ozato, K., Hansen, T.H., and Sachs, D.H. (1980b).** Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens. II. Antibodies to H-2Ld antigen, the product of a third polymorphic locus of the major histocompatibility complex. *J. Immunol.* 125, 2473-2477.
- Paesen, G. C., and Nuttall, P. A. (1996).** A tick homologue of the human Ki nuclear autoantigen. *Biochim Biophys Acta* 1309, 9-13.
- Pardo, P. S., Murray, P. F., Walz, K., Franco, L., and Passeron, S. (1998).** In vivo and in vitro phosphorylation of the alpha 7/PRS1 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* 20 S proteasome: in vitro phosphorylation by protein kinase CK2 is absolutely dependent on polylysine. *Arch Biochem Biophys* 349, 397-401.
- Pellis , A., Roig, C., Barraquer-Bord s, L., and Ferrer, I. (1996).** Abnormal, ubiquitinated cortical neurites in patients with diffuse Lewy body disease. *Neuroscience Lett.* 206, 85-88.
- Penna, A., Chisari, F. V., Bertolletti, A., Missale, G., Fowler, P., Giuberti, T., Fiaccadori, F., and Ferrari, C. (1991).** Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J. Exp. Med.* 174, 1565-1569.
- Pereira, M. E., and Wilk, S. (1990).** Phosphorylation of the multicatalytic proteinase complex from bovine pituitaries by a copurifying cAMP-dependent protein kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 68-74.
- Peters, J. M., Harris, J. R., and Kleinschmidt, J. A. (1991).** Ultrastructure of the ~26S complex containing the ~20S cylinder particle (multicatalytic proteinase/proteasome). *Eur. J. Cell. Biol.* 56, 422-32.
- Peters, J. M., Cejka, Z., Harris, J. R., Kleinschmidt, J. A., and Baumeister, W. (1993).** Structural features of the 26 S proteasome complex. *J. Mol. Biol.* 234, 932-937.
- Peters, J.-M., Franke, W. W., and Kleinschmidt, J. A. (1994).** Distinct 19 S and 20S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 269, 7709-7718.
- Petit, F., Jarousse, A.-S., Dahlmann, B., Sobek, A., Hendil, K. B., Buri, J., Briand, Y., and Schmid, H.-P. (1997).** Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation. *Biochem. J.* 326, 93-98.
- Plemper, R. K., and Wolf, D. H. (1999).** Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci* 24, 266-70.
- Portis, J. L., and Lynch, W. P. (1998).** Dissecting the determinants of neuropathogenesis of the murine oncornaviruses. *Virology* 247, 127-136.
- Pryhuber, K. G., Murray, K. J., Donnelly, P., Passo, M. H., Maksymowych, W. P., Glass, D. N., Giannini, E. H., and Colbert, R. A. (1996).** Polymorphism in the LMP2 gene influences disease susceptibility and severity in HLA-B27 associated juvenile rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 23, 747-52.
- Rammensee, H.G., Falk, K. and R ttschke, O. (1993)** Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 213-244.

- Ramos, C., Sanchez, G., Pando, R. H., Baquera, J., Hernandez, D., Mota, J., Ramos, J., Flores, A., and Llausas, E. (1998).** Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J. Neurovirol* 4, 465-468.
- Realini, C., Rogers, S. W., and Rechsteiner, M. (1994).** KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC Class I receptors. *FEBS Lett.* 348, 109-113.
- Realini, C. A., and Rechsteiner, M. C. (1996).** Proposed role of a γ -Interferon inducible proteasome-regulator in antigen presentation. *Intracellular Protein Catabolism*, Plenum Press, New York 1996, 51-61.
- Realini, C., Jensen, C. C., Zhang, Z., Johnston, S. C., Knowlton, J. R., Hill, C. P., and Rechsteiner, M. (1997).** Characterization of recombinant REG α , REG β , and REG γ proteasome activators. *J. Biol. Chem.* 272, 25483-25492.
- Reimann, J., and Kaufmann, H.E. (1997)** Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. *Current Opinion in Immunol.* 9, 462-469.
- Reits, A. J., Benham, A. M., Plougastel, B., Neefjes, J., and Trowsdale, J. (1997).** Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J.* 16, 6087-6094.
- Perry, V. H. (1998).** A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J. Neuroimmunology* 90, 113-121.
- Rivett, A. J. (1998).** Intracellular distribution of proteasomes. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 110-114.
- Robertson, M. 1991.** Antigen processing: Proteasomes in the pathway. *Nature* 353, 300-301.
- Rock K.L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D. and Goldberg A.L. (1994).** Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761.
- Rock, K. L., and Goldberg, A. L. (1999).** Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 739-779.
- Russell, S. J., Reed, S. H., Huang, W., Friedberg, E. C., and Johnston, S. A. (1999).** The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol. Cell* 3, 687-695.
- Salzmann, U. (1998).** Expression und funktionelle in vitro-Charakterisierung rekombinanter Regulatorproteine. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin
- Salzmann, U., Kral, S., Braun, B., Standera, S., Schmidt, M., Kloetzel, P. M., and Sijts, A. (1999).** Mutational analysis of subunit i beta2 (MECL-1) demonstrates conservation of cleavage specificity between yeast and mammalian proteasomes. *FEBS Lett* 454, 11-15.
- Schägger H. and Jagow G.V. (1987).** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368.
- Schechter, I., and Berger, A. (1967).** On the size of the active site in proteases. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 27, 157-162.
- Schmid, H. P., Akhayat, O., Martins, D. S. C., Puvion, F., Koehler, K., and Scherrer, K. (1984).** The prosome: an ubiquitous morphologically distinct RNP particle associated with repressed mRNPs and containing specific ScRNA and a characteristic set of proteins. *EMBO J.* 3, 29-34.
- Schmidtke, G., Frentzel, S., Schmidt, M., and Kloetzel, P.-M. (1997).** Biogenesis of 20 S proteasomes: hsc73 is a component of P1 proteasome precursor complexes. A role for chaperones in the assembly of mammalian 20 S proteasome. *J. Mol. Biol.* 268, 95-106.
- Schubert, U., Anton, L. C., Bacik, I., Cox, J. H., Bour, S., Bennink, J. R., Orlowski, M., Strebel, K., and Yewdell, J. W. (1998).** CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J. Virol.* 72, 2280-2288.
- Schwartz, A. L., and Ciechanover, A. (1999).** The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Med.* 50, 57-74.

- Seeger, M., Ferrell, K., Frank, R., and Dubiel, W. (1997).** HIV-1 tat inhibits the 20 S proteasome and its 11 S regulator-mediated activation. *J. Biol. Chem.* 272, 8145-8148.
- Seelig, A., Boes, B., and Kloetzel, P. M. (1993).** Characterization of mouse proteasome subunit MC3 and identification of proteasome subtypes with different cleavage characteristics. *Enzyme Protein* 47, 330-342.
- Seliger, B., Harders, C., Lohmann, S., Momburg, F., Urlinger, S., Tampe, R., and Huber, C. (1998).** Down-regulation of the MHC class I antigen-processing machinery after oncogenic transformation of murine fibroblasts. *Eur. J. Immunol.* 28, 122-133.
- Sewell, A. K., Price, D. A., Teisserenc, H., Booth, B. L., Jr., Gileadi, U., Flavin, F. M., Trowsdale, J., Phillips, R. E., and Cerundolo, V. (1999).** IFN-gamma exposes a cryptic cytotoxic T lymphocyte epitope in HIV-1 reverse transcriptase. *J. Immunol.* 162, 7075-7079.
- Shimbara, N., Nakajima, H., Tanahashi, N., Ogawa, K., Niwa, S., U., A., Nakayama, E., and Tanaka, K. (1997).** Double cleavage production of the CTL epitope by proteasomes and PA28: role of the flanking region. *Genes Cells* 2, 785-800.
- Shimbara, N., Ogawa, K., Hidaka, Y., Nakajima, H., Yamasaki, N., Niwa, S., Tanahashi, N., and Tanaka, K. (1998).** Contribution of proline residue for efficient production of MHC class I ligands by proteasomes. *J. Biol. Chem.* 273, 23062-23071.
- Sibille, C., Gould, K.G., Willard-Gallo, K., Thomson, S., Rivett, A.J., Powis, S., Butcher, G.W. and De Baetselier, P. (1995)** LMP2⁺ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Curr. Biol.* 5, 923-930.
- Sirma, H., Weil, R., Rosmorduc, O., Urban, S., Israel, A., Kremsdorf, D., and Brechot, C. (1998).** Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome. *Oncogene* 16, 2051-63.
- Song X., Mott J.D., Kampen J.v., Pramanik B., Tanaka K., Slaughter C.A. and DeMartino G.N. (1996).** A model for the quaternary structure of the proteasome activator PA 28. *J. Biol. Chem.* 271, 26410-26417.
- Song X., Kampen J.v., Slaughter C.A. and DeMartino G.N. (1997).** Relative functions of the a and b subunits of the proteasome activator, PA28. *J. Biol. Chem.* 272, 27994-28000.
- Soza, A. (1997).** Funktionelle Charakterisierung des PA28 Komplexes - eines Proteinaktivators des 20S Proteasoms. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Soza A., Knühl C., Groettrup M., Henklein P., Tanaka K., Kloetzel P.M. (1997).** Expression and subcellular localization of mouse 20S proteasome activator complex PA28. *FEBS Lett.* 413, 27-34.
- Spataro, V., Norbury, C., and Harris, A. L. (1998).** The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *Br J Cancer* 77, 448-455.
- Stohwasser, R., and Kloetzel, P.-M. (1996).** Cytokine induced changes in proteasome subunit composition are concentration dependent. *Biol. Chem.* 377, 571-577.
- Stohwasser, R., Kuckelkorn, U., Kraft, R., Kostka, S., and Kloetzel, P.-M. (1996).** 20S proteasome from LMP7 knock out mice reveals altered proteolytic activities and cleavage site preferences. *FEBS Lett.* 383, 109-113.
- Stohwasser, R., Standera, S., Peters, I., Kloetzel, P.-M., and Groettrup, M. (1997).** Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECl-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon- γ -modulated proteasome subunits. *Eur. J. Immunol.* 27, 1182-1187.
- Stohwasser, R., Giesebrecht, G., Kraft, R., Müller, E.-C., Häusler, K. G., Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., and Kloetzel, P.-K. (1999).** Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia: induction of immunoproteasomes by interferon- γ and lipopolysaccharide. *Glia*, in press.
- Streit, W. J., Graeber, M. B., and Kreutzberg, G. W. (1989).** Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 21, 117-123.
- Tanahashi N., Yokota K., Ahn J.Y., Chung C.H., Fujiwara T., Takahashi E., DeMartino G.N., Slaughter C.A., Toyonaga T., Yamamura K., Shimbara N. and Tanaka K. (1997).** Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and g-interferon regulation. *Genes Cell* 2, 195-211.

- Tanaka, K.** and Kasahara, M. (1998). The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol. Rev.* 163, 161-176.
- Tanaka K.,** Yoshimura T., Ichihara A., Kameyama K. and Takagi T. (1986). A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. II. Properties of the purified enzyme. *J. Biol. Chem.* 261, 15204-15207.
- Tanaka, K.,** Yoshimura, T., Kumatori, A., Ichihara, A., Ikai, A., Nishigai, M., Kameyama, K., and Takagi, T. (1988). Proteasomes (multi-protease complexes) as 20 S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 263, 16209-16017.
- Tanaka, K.,** and Ichihara, A. (1989a). Autodegradation of rat liver proteasomes (large multicatalytic proteinase complexes). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 548-554.
- Tanaka, K.,** and Ichihara, A. (1989b). Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 159, 1309-1315.
- Tanaka, K.,** Yoshimura, T., and Ichihara, A. (1989). Role of substrate in reversible activation of proteasomes (multi-protease complexes) by sodium dodecyl sulfate. *J. Biochem. Tokyo* 106, 495-500.
- Tanaka, K.,** Tanahashi, N., Tsurumi, C., Yokota, K. Y., and Shimbara, N. (1997). Proteasomes and Antigen Processing. *Adv. Immunol.* 64, 1-38.
- Tojo, T.,** Kaburaki, J., Hayakawa, M., Okamoto, T., Tomii, M., and Homma, M. (1981). Precipitating antibody to a soluble nuclear antigen "ki" with specificity for systemic lupus erythematosus. *Ryumachi* 21, 129.
- Tokumoto, T.,** Tokumoto, M., Seto, K., Horiguchi, R., Nagahama, Y., Yamada, S., Ishikawa, K., and Lohka, M. J. (1999). Disappearance of a novel protein component of the 26S proteasome during *Xenopus* oocyte maturation. *Exp. Cell Res.* 247, 313-319.
- Ugai, S.,** Tamura, T., Tanahashi, N., Takai, S., Komi, N., Chung, C. H., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1993). Purification and characterization of the 26S proteasome complex catalyzing ATP-dependent breakdown of ubiquitin-ligated proteins from rat liver. *J. Biochem. (Tokyo)* 113, 754-768.
- Ustrell, V.,** Pratt, G., and Rechsteiner, M. (1995). Effects of interferon γ and major histocompatibility complex-encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 584-588.
- Van Kaer, L.,** Ashton-Rickardt, P.G., Eichelberger, M., Gaczynska, M., Nagashima, K., Rock, K.L., Goldberg, A.L., Doherty, P.C. and Tonegawa, S. (1994) Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* 1: 533-541.
- Waldman, T. A.,** Tagaya, Y. und Bamford, R. (1998). Interleukin-2, Interleukin-15 and their receptors. *Int. Rev. Immunol.* 16, 205-226.
- Walz, J.,** Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A. J., and Baumeister, W. (1998). 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 121, 19-29.
- Wekerle, H.,** Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., and Linington, C. (1994). Animal models. *Ann. Neurol.* 36, 47-53.
- Wigle, D.,** Ho, W., Lo, D., Francis, J., Eubanks, J. H., and Wallace, M. C. (1999). Altered expression levels of SEF-2 and p112 in the rat hippocampus after transient cerebral ischemia: identification by mRNA differential display. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 19, 435-442.
- Wojcik, C.** (1999). Proteasome activator subunit PA28 α and related Ki antigen (PA28 γ) are absent from the nuclear fraction purified by sucrose gradient centrifugation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 273-276.
- Wright, S.D.,** Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R. J., Mathison, I.C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-1433.
- Wright, K. L.,** White, L. C., Kelly, A., Beck, S., Trowsdale, J., Ting, J. P.-Y. (1995) Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter. *J. Exp. Med.* 181, 1459-1471.

- Xu, J., and Ling, E. A.** (1994) Expression of major histocompatibility complex class II antigen on amoeboid microglial cells in early postnatal rat brain following intraperitoneal injections of lipopolysaccharide. *Exp. Brain Res.* 100, 287-92.
- Yellen-Shaw, A. J., and Eisenlohr, L. C.** (1997). Regulation of class I-restricted epitope processing by local or distal flanking sequence. *J. Immunol.* 158, 1727-1733.
- Zaiss, D. M. W., Standera, S., Holzthutter, H., Kloetzel, P.-M., and Sijts, A. J. A. M.** (1999). The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to proteasomes. *FEBS Lett* 457, 333-338.
- Zaiss, D. M., and Kloetzel, P. M.** (1999). A second gene encoding the mouse proteasome activator PA28beta subunit is part of a LINE1 element and is driven by a LINE1 promoter *J. Mol. Biol.* 287, 829-835.
- Zhang, Z., Clawson, A., Realini, C., Jensen, C. C., Knowlton, J. R., Hill, C. P., and Rechsteiner, M.** (1998a). Identification of an activation region in the proteasome activator REGalpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 2807-2811.
- Zhang, Z., Clawson, A., and Rechsteiner, M.** (1998b). The proteasome activator 11 S regulator or PA28. Contribution by both alpha and beta subunits to proteasome activation. *J. Biol. Chem.* 273, 30660-30668.
- Zhang, Z., Realini, C., Clawson, A., Endicott, S., and Rechsteiner, M.** (1998c). Proteasome activation by REG molecules lacking homolog-specific inserts. *J. Biol. Chem.* 273, 9501-9509.
- Zhang, Z., Krutchinsky, A., Endicott, S., Realini, C., Rechsteiner, M., and Standing, K. G.** (1999). Proteasome activator 11S REG or PA28: recombinant REG alpha/REG beta hetero-oligomers are heptamers. *Biochemistry* 38, 5651-5658.
- Zhou, P., Cao, H., Smart, M., and David, C.** (1993). Molecular basis of genetic polymorphism in major histocompatibility complex-linked proteasome gene (Lmp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2681-2684.
- Zwickey, H. L., and Potter, T. A.** (1999). Antigen secreted from noncytosolic *Listeria monocytogenes* is processed by the classical MHC class I processing pathway. *J. Immunol.* 162, 6341-6350.

- [1] **Stohwasser, R. and Kloetzel, P.-M. (1996).** Cytokine induced changes in proteasome subunit composition are concentration dependent.
[Biol. Chemistry 377](#): 571-577.

- [2] Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., **Stohwasser R,** and Kloetzel P. (1996). A third interferon- γ -induced subunit exchange in the 20S proteasome.
Eur. J. Immunol. 26: 863-869.

- [3] **Stohwasser, R., Standera, S., Peters, I., Kloetzel, P.-M., Groettrup, M. (1997).** Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon- γ -modulated proteasome subunits. **Eur. J. Immunol. 27: 1182-1187.**

- [4] Groettrup, M., Standera, S., **Stohwasser, R.,** and Kloetzel, P.-M. (1997). The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S-Proteasome. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94](#): 8970-8975.

- [5] **Stohwasser, R., Kuckelkorn, U., Kraft, R., Kostka, S., and Kloetzel, P.-M. (1996).** 20S proteasome from LMP7 knock out mice reveals altered proteolytic activities and cleavage site preferences.
FEBS Lett. 383: 109-113.

- [6] **Stohwasser, R., Giesebrecht, J., Kraft, R., Müller, E.-C., Husler, G., Kettenmann, H., Hanisch, U.K., and Kloetzel, P.-K. (2000).** Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia: induction of immunoproteasomes by interferon- γ and lipopolysaccharide. [Glia 29](#): 355-65.

- [7] Kloetzel P.M., Soza A. and **Stohwasser, R. (1999).** The role of the proteasome system and the proteasome activator PA28 complex in the cellular immune response. [Biol. Chem. 380](#): 293-297.

II. Publikationen zu „2. ERGEBNISSE A“

Die in den Kapiteln 3.1.3-3.1.5. (S. 23-29) zusammenfassend dargestellten Ergebnisse wurden inzwischen publiziert:

Stohwasser, R., Salzmann, U., Giesebrecht, J., Kloetzel, P.M. , Holzhutter, H.G. **(2000).** Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28.

[Eur. J. Biochem. 267: 6221-6230.](#)

Ebenso liegen Ergebnisse aus Kapitel 3.1.2 (S. 21-22) als Publikation vor:

Stohwasser, R., Soza, A., Eggers, M., Koszinowski, U.H. Kloetzel, P.M. **(2000).** PA28alphabeta double and PA28beta single transfectant mouse B8 cells lines reveal enhanced presentation of a mouse cytomegalovirus (MCMV) pp89 MHC class I epitope.

[Mol. Immunol. 37: 13-9.](#)

Die Publikationsrechte der genannten Arbeiten liegen bei den entsprechenden Verlagen.

7.1. Verzeichnis der Tabellen

Seite

Tabelle 1: Kinetik der Assemblierung von PA28 und Aktivierung des 20S-Proteasoms	25
Tabelle 2: Kinetische Parameter der Hydrolyse fluorogener Peptidsubstrate	29
Tabelle 3: Bindung von Peptiden im YTH-Screening mit PA28a	50
Tabelle 4: Vergleich der Inhibitorkonstanten selektiver Proteasominhibitoren	53
Tabelle 5: Oligonukleotidprimer zur PCR-Klonierung von pGEX-Konstrukten	66
Tabelle 5: Oligonukleotidprimer zur PCR-Klonierung von YTH-Vektoren	66
Tabelle 6: Interne Mutageneseprimer zur PCR-Klonierung von PA28 α -Konstrukten	67
Tabelle 8: Oligonukleotidprimer zur PCR-Klonierung der Proteasom-UE α 4/MC6-I	67

7.2. Verzeichnis der Abbildungen	Seite
Abb. 1: Das Ubiquitin-Proteasom-System der Proteindegradation	2
Abb. 2: Strukturmodelle des Proteasoms	4
Abb. 3: Modellvorstellungen zur Antigenpräsentation	7
Abb. 4: Immunpräzipitation von PA28-20S-PA700-Proteasekomplexen aus B8- Fibroblasten der Maus	20
Abb. 5: Molekulare Ursachen einer verbesserten MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation nach Transfektion von B8-Fibroblasten mit PA28 β und PA28 $\alpha\beta$	22
Abb. 6: Biochemische Charakterisierung rekombinanter PA28-Proteine	24
Abb. 7: Kinetische Modellierung der Assemblierung und Aktivierung des 20S-Proteasoms durch monomere und hexamere/heptamere Komplexe aus recPA28 α , recPA28 β und recPA28 $\alpha\beta$	
Abb. 8: Peptidtranslokationsmodell der Aktivierung des 20S-Proteasoms: recPA28 $\alpha/\beta/\alpha\beta$ vermitteln die Aktivierung der Hydrolyse fluorogener Peptide	26
Abb. 9: Proteasomale Schnittpräferenzen in Gegenwart rekombinanter PA28-Proteine	31
Abb. 10: Strukturelle Eigenschaften von Proteinen der PA28-Familie	33
Abb. 11: "Yeast two-hybrid"-Interaktionsstudie - PA28 α -Mutagenese	34
Abb. 12: Aktivierung des 20S-Proteasoms durch die KEKE-Mutante PA28 α -(Δ 70-91)	36
Abb. 13: Funktionsanalyse von PA28 γ in B8-Fibroblasten	38
Abb. 14: Rekombinantes PA28 γ bildet 11S-Komplexe und aktiviert das 20S-Proteasom in vitro	40
Abb. 15: Nachweis der Proteine der PA28-Familie im Nukleoplasma von RMA-Zellkernen	42
Abb. 16: Einfluß von IFN- γ auf Expression und Stabilität von PA28 γ	44
Abb. 17: Protein-Protein-Interaktionen (PPI) des PA28 γ -Proteins	46
Abb. 18: Protein-Protein-Interaktionen der Proteasom-UE α 4/MC6-I mit PA28 α und PA28 β	48
Abb. 19: Das HBx-Protein, ein Inhibitor der Proteasomaktivierung	52

7.3. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. P.-M. Kloetzel danke ich für die stete Unterstützung meiner Forschungsarbeit und das hervorragende wissenschaftlich-technische Umfeld in seiner Arbeitsgruppe. Ideen für zahlreiche Projekte sind aus anregenden Diskussionen mit ihm und innerhalb unserer Arbeitsgruppe hervorgegangen. Herrn Prof. Kettenmann möchte ich für die Unterstützung seiner Arbeitsgruppe bei neurowissenschaftlichen Fragestellungen danken. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Uwe Hanisch, dessen Zuverlässigkeit als Kooperationspartner und Freund für die erfolgreiche Durchführung des Mikroglia-Projektes unentbehrlich war. Herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. H.-G. Holzhütter für die komplexen kinetische Modellierungen meiner experimentellen Daten und die furchtbaren wie fruchtbaren Diskussionen kinetischer Modelle. Weiteren Kooperationspartnern, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls herzlichst danken: Dr. Regine Kraft, Dr. Eva-Christina Müller (Proteinsequenzierung), Dr. Peter Henklein (Peptidsynthesen), Ina Wagner (automatisierte DNA-Sequenzierungen), Dr. Thomas Ruppert (Massenspektrometrie), Dr. Claudia Eder (erste Anleitung zur Etablierung von Mikroglia-Kulturen), Dr. Hans-Jörg Fehling (Überlassung von LMP7-"knock out"- Mäusen), Dr. Klavs Hendil (anti-p45-Ab).

Besonders danken möchte ich auch Dr. Marcus Groettrup für seine kooperative Zusammenarbeit im Rahmen der durch unsere gemeinsamen Publikationen dokumentierten Projekte.

Ganz besonders bin ich Frau Dipl. Ing. Inga Peters für ihre zuverlässige technische Assistenz zu Dank verpflichtet. Ebenso möchte ich Frau Sybille Standera für ihre Mitarbeit im Rahmen einiger Experimente danken.

Frau Dr. Andrea Soza hat die PA28 β - und die PA28a β -Transfektanten in unserem Labor etabliert. Einige Daten aus ihrer Dissertation fanden Eingang in die hier vorgelegte Arbeit. Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit möchte ich ihr an dieser Stelle herzlich danken. Herrn Dipl. Biol. Dietmar Zaiss möchte ich für die Überlassung eines eukaryontischen Expressionskonstruktes, welches ich zur Etablierung der B8 γ 2H-Transfektante verwendet habe, danken. Einige Ergebnisse der von mir betreuten Diplomarbeit von Frau Dipl. Biol. Ulrike Salzmann lieferten die Voraussetzungen zur in vitro Analyse der Proteasomaktivierung durch rekombinante PA28-Proteine - auch hier ein herzliches Dankeschön für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit. "Last but not least" möchte ich Herrn Dipl.-Biochem. Jan Giesebrecht für die im Rahmen seiner von mir betreuten Diplomarbeit geleistete Mitarbeit danken. Einige von uns gemeinsam durchgeführte Experimente sind Bestandteil seiner Promotionsarbeit und wurden in dieser Arbeit verwendet.

Dr. Jacqueline Ay möchte ich für die Unterstützung bei der Erstellung von Strukturabbildungen mit MOLSCRIPT sowie eine Einführung in das UNIX-Betriebssystem danken.

Bei allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie möchte ich mich herzlich für das kollegiale Klima und die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Meiner Frau Christa danke ich nicht nur für die Korrektur der vorliegenden Arbeit sondern auch für die liebevolle Unterstützung meiner zeitintensiven "Freizeitbeschäftigung" mit dem Proteasom.

Den Hochschullehrern, die mich während des Studiums begleitet haben, möchte ich an dieser Stelle danken. Besonders danke ich Prof. Dr. Augustin Betz (Institut für Pflanzenphysiologie, Universität Bonn) für den ansteckenden wissenschaftlichen Enthusiasmus in seinen Vorlesungen und Seminaren, der mich zur Durchführung meiner Diplomarbeit in seinem Institut veranlaßte, Prof. Dr. Volker Sandhoff (Inst. f. Biochemie, Universität Bonn) für die Heranführung an die Biochemie, Prof. E.K.F. Bautz (Inst. f. Molekulare Genetik) für die Molekularbiologische Ausbildung während meiner Promotionsarbeit und Prof. Dr. Gholamreza Darai für die Einführung in die Molekulare Virologie.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die im Rahmen des Schwerpunktprogramms "Funktionen der Mikroglia bei neurodegenerativen Erkrankungen" (sto 357-1-1) zur Verfügung gestellten Finanzmittel. Den vorwiegend neurowissenschaftlich orientierten Mitgliedern des Schwerpunktes danke ich für ihre Bereitschaft, meine biochemisch-molekularbiologischen Proteasom-Projekte im Rahmen interdisziplinärer Kooperationen in das aufregende Arbeitsgebiet des Schwerpunktes zu integrieren.

7.4 Erklärung

- ◆ Die vorgelegte Habilitationsschrift wurde ohne fremde Hilfe verfaßt,
- ◆ die beschriebenen Ergebnisse - sofern nicht anders vermerkt- wurden selbst gewonnen
- ◆ und die verwendeten Hilfsmittel und die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND PERSPEKTIVEN

Das 20S-Proteasom ist als zentrale multikatalytische Protease des Cytosols und des Nukleus in nahezu alle basalen zellulären Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Apoptosis und "stress response" sowie in spezialisierte Funktionen innerhalb der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation involviert.

Die Koordinierung dieser vielfältigen Funktionen findet nach heutigem Erkenntnisstand vorwiegend auf zwei Ebenen statt. Erstens bedingt die strukturelle Plastizität des 20S-Proteasoms, d.h. die Interferon- γ -abhängige Substitution von "active site"-Untereinheiten, Veränderungen der Schnittpräferenzen, die sich auf die Hierarchie der cytotoxischen T-Zellantwort auswirken können. Zweitens erfordert die Koordinierung der Aufgaben des Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweges die Interaktion des 20S-Proteasoms mit zahlreichen Regulatoren wie dem Proteasomaktivators PA700, dem in vitro inhibitorisch wirkenden PI31-Protein und mit drei verschiedenen Proteinen der PA28-Familie, deren Funktionen nur in Grundzügen aufgeklärt worden sind.

In dieser Arbeit wurde zunächst dem Aspekt der strukturellen Plastizität Beachtung geschenkt.

Es wurde gezeigt, daß in verschiedenen Zellen und Geweben IFN- γ und in primären Mikrogliazellen auch LPS, eine Induktion von drei β -UE bewirken, die drei konstitutive homologe Untereinheiten des 20S Proteasoms ersetzen. Die resultierenden Immunoproteasomen sind in der Lage gewisse MHC-Klasse-I-restringierte Epitope mit veränderter Effizienz zu generieren. Der Nachweis von Immunoproteasomen in aktivierter Mikroglia ist ein weiterer Beleg für Funktionen dieses spezialisierten Zelltyps innerhalb der zellulären Immunantwort des ZNS. Mit dem Nachweis einer LPS-Induktion von Immunoproteasomen in Mikroglia deutet sich an, daß dem Proteasom-Ubiquitin-Degradationsweg in Makrophagen-ähnlichen Zellen des ZNS auch eine Rolle bei der Prozessierung exogener bakterielle Antigene, die normalerweise endolysosomal prozessiert und über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden, zukommt. Außerdem ergaben sich Hinweise auf eine Modulation des PA700-Komplexes in LPS-induzierter Mikroglia. Es wurde ein 50-kDa-Protein entdeckt, bei dem es sich entweder um eine neue PA700-UE oder um ein transient assoziiertes Protein handelt.

In dieser Arbeit wurden zwei neue UE des Proteasoms der Maus, nämlich das Substitutionspaar β 2/MC14 und $i\beta$ 2/MECL-1, identifiziert und kloniert. Der Befund, daß sich die Integration der UE $i\beta$ 1/LMP2 und $i\beta$ 2/MECL-1 ins Proteasom wechselseitig bedingt unterstreicht die enge strukturelle und möglicherweise auch funktionelle Kooperation dieser beiden UE. In $i\beta$ 5/LMP7-"knock out"-Mäusen wurde eine weitere Substitution, nämlich die der UE β 5/MB1 analysiert. Die $i\beta$ 5/LMP7-UE ist für den Einbau von $i\beta$ 1/LMP2 und $i\beta$ 2/MECL-1 entbehrlich.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der funktionellen Analyse der Proteasomaktivatoren der PA28-Familie. Hierzu wurden drei verschiedene methodische Ansätze verfolgt. In vivo-Effekte auf die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation wurden in B8-Transfektanten, unserem Modellsystem für die Prozessierung und Präsentation des pp89-proteins des Mauscytomegalovirus, untersucht. Biochemische Mechanismen der Proteasomaktivierung durch PA28-Proteine wurden in vivo in einem neu etablierten

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND PERSPEKTIVEN

Rekonstitutionssystem unter Verwendung kinetischer Modelle analysiert. Protein-Protein-Interaktionsstudien wurden herangezogen, um Aufschlüsse über mögliche Funktionen von PA28-Proteine zu erhalten und um Bindungspartner regulatorische Proteine im 20S-Proteasom zu identifizieren.

Eine autonome Funktion des PA28 β -Proteins konnte in B8-Transfektanten aus methodischen Gründen nicht belegt werden, da die Überexpression von PA28 β zu einer Selektion auf Zellen führt, die gleichzeitig PA28 α überexprimierten. Die verbesserte MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation war also auf erhöhte Mengen von PA28 $\alpha\beta$ -Komplexen zurückzuführen. Im in vitro Rekonstitutionssystem wurde dennoch eine autonome Aktivierung des 20S-Proteasoms durch PA28 β gemessen, ein Hinweis darauf, daß dieses Protein nicht nur ein Verstärker der PA28 α -Funktion ist, sondern möglicherweise in Zusammenhang mit anderen zellulären Strukturen als autonomer Proteasomaktivator wirken könnte.

In kinetischen Studien konnten wir die kinetischen Parameter der Assemblierung verschiedener Proteasomaktivatorkomplexe messen. Diese Daten lassen sich dahingehend interpretieren, daß monomere PA28 α - oder PA28 β -Proteine zu einer basalen Aktivierung des Proteasoms führen, während heteromere Hexamere und homomere Heptamere zur maximalen Aktivierung des 20S-Proteasoms beitragen. Der heterohexamere PA28 $\alpha\beta$ -Komplex bindet mit wesentlich größerer Affinität ans Proteasom, als die homomeren Heptamer-Komplexe.

Die kinetische Modellierung biphasischer Substratabhängigkeitskurven enthält starke Evidenzen für ein Translokationsmodell von Peptidsubstraten ins Proteasom oder von Produktpeptiden aus dem Proteasom heraus. In Analogie zu Transportmodellen der erleichterten Diffusion fungieren die Aktiven Zentren des Proteasoms als "sink" oder "source" für Peptide, die an externen Substratbindungsstellen oder interne Produktbindungsstellen binden. Kandidaten für solche Stellen können in Abwesenheit von PA28 die aminoterminalen Enden der α -Proteasom-UE sein. In Gegenwart von PA28 kommen Peptidbindende Eigenschaften von PA28-hinzu, die Peptide von den proteasomalen Bindungsstellen empfangen oder an diese weitergeben, je nach dem ob ein "sink" oder "source"-Szenarium der aktiven Zentren im inneren des 20S-Proteasoms vorliegt.

Das PA28 γ -Protein bewirkt im Antigenpräsentationsmodell ebenfalls eine geringe Verbesserung der Präsentation des immundominanten pp89-Epitops. Eine Überexpression von PA28 α oder PA28 β in Transfektanten konnte inzwischen ausgeschlossen werden. Der beobachtete Effekt auf die Antigenpräsentation ist unerwartet, da die Peptidaseaktivitäten des Proteasoms in vitro nur geringfügig stimuliert werden. Daher wurde nach Interaktionspartnern von PA28 γ gesucht, die die verbesserte Antigenpräsentation über einen anderen Mechanismus plausibel erscheinen lasse. Es konnte gezeigt werden, das neben der starken homomeren Interaktion in vitro auch eine Bindung an den Proteasominhibitor PI31 erfolgt. So könnte PA28 γ über die Sequestrierung eines inhibitorischen Proteins indirekt zur verbesserten Aktivität des Proteasoms und einer vermehrten Generierung des pp89-Epitops beitragen.

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND PERSPEKTIVEN

Im YTH wurde die Proteasom-UE MC6 als Interaktionspartner von allen drei PA28-Proteinen identifiziert. Die MC6-UE gilt auch als Interaktionspartner viraler Faktoren wie dem HBx-Protein des Hepatiits-B-Virus. Das HBx-Protein ist für die virale Replikation nicht erforderlich, scheint jedoch für die hepatozelluläre Kanzerogenese von Bedeutung zu sein. In unserm in vitro Rekonstituitionsmodell der Aktivierung des Proteasoms konnten wir einer Inhibierung der PA28-vermittelten Aktivierung des Proteasoms durch ein HBx-Peptid nachweisen, welches der interagierenden Domäne des HBx-Proteins mit der MC6-UE entspricht. Eine solche Interaktion könnte im Kontext der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation von hepatozellulärer Karzinomzellen die Basis eines "Immunescape"-Mechanismuses HBV-infizierter Zellen oder HBx-exprimierender Tumorzellen darstellen.

Unserer methodischer Ansatz eines in vitro Modells der Proteasomaktivierung wird in Zukunft die Identifizierung weiterer Faktoren ermöglichen, die die Prozessierung von immundominanten Epitopen fördern oder als virale Interferenzfaktoren an der Suppression der Antigenpräsentation beteiligt sein können. In Kombination mit in vivo-Antigenpräsentationsmodelle lassen sich aus diesen Untersuchungen Erkenntnisse ableiten, die von direkter medizinischer Relevanz sind.

Das 26S-Proteasom ist als cytosolische und nukleäre multikatalytische Protease in die Regulation basaler zellulärer Vorgänge wie Proliferation und Differenzierung, Signaltransduktion, Apoptose und zelluläre Stressantwort involviert. Darüberhinaus ist das 20S-Proteasom und seine assoziierten Regulatorkomplexe an der Epitop-Prozessierung innerhalb der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation beteiligt.

Die Koordinierung dieser Funktionen findet auf zwei Ebenen statt. Erstens bedingt die strukturelle Plastizität des 20S-Proteasoms - d.h. die Interferon- γ -abhängige Substitution von "active site"-Untereinheiten - Veränderungen der Schnittpräferenzen, die sich auf die Hierarchie der cytotoxischen T-Zellantwort auswirken. Zweitens bewirkt die Interaktion mit Aktivator komplexen wie PA700 oder PA28 eine Erweiterung des Spektrums von Funktionen, die innerhalb des Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweges wahrgenommen werden. So ist das PA700-Modul die molekulare Erkennungs- und Entfaltungsmaschine und der PA28-Komplex ein Prozessierungsmodulator des Proteasoms.

In dieser Arbeit wurden zunächst Aspekte der strukturellen Plastizität des 20S-Proteasoms sowie des PA700-Komplexes untersucht. Zwei neue UE des Proteasoms der Maus, nämlich das Substitutionspaar $\beta 2$ /MC14 und $i\beta 2$ /MECL-1, wurden identifiziert und kloniert. Der Befund, daß sich die Integration der UE $i\beta 1$ /LMP2 und $i\beta 2$ /MECL-1 ins Proteasom wechselseitig bedingt, unterstreicht die enge strukturelle und funktionelle Kooperation dieser beiden UE. In Geweben der Maus weisen die IFN- γ -induzierbaren Untereinheiten und die konstitutiven Austauschpartner reziproke Expressionsmuster auf. In lymphatischen Geweben dominieren die hohen mRNA-Mengen der Immunoproteasom-UE gegenüber niedrigen mRNA-Mengen der konstitutiven "active-site"-UE, während in nicht-lymphatischen Geweben wie z.B dem Gehirn der umgekehrte Sachverhalt beobachtet wurde. In $i\beta 5$ /LMP7-"knock out"-Mäusen wurde der kompensatorische Einbau der UE $\beta 5$ /MB1 beobachtet und

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND PERSPEKTIVEN

die katalytischen Auswirkungen dieser Substitution gemessen. Die i β 5/LMP7-UE wird für den Einbau von i β 1/LMP2 und i β 2/MECL-1 nicht benötigt.

Die Mikroglia ist als Makrophagen-ähnliche Zelle eine immunologisch relevante Effektorzelle des ZNS, die von viralen und bakteriellen Pathogenen infiziert werden kann. Im Gehirn der Maus fanden wir unter normalen Bedingungen eine Dominanz der konstitutiven Proteasom-Subpopulation. Von Interesse war, ob in Mikroglia unter Bedingungen, die pathologische Situationen simulieren, also z.B. nach Induktion mit IFN- γ oder LPS, Veränderungen in proteasomalen Proteasekomplexen auftreten, die mit dem Aktivitätszustand der Mikroglia korrelieren. Tatsächlich konnten wir in IFN- γ - oder LPS-aktivierter Mikroglia die Induktion von Immunoproteasomen sowie die Induktion eines LPS-induzierbaren, PA700-assoziierten Proteins, nachweisen. Die Modulation des Proteasoms durch LPS, einer Glykolipidkomponente gramnegativer Bakterien, ist ein indirekter Hinweis auf eine Beteiligung des Proteasoms an der Prozessierung bakterieller Antigene, die normalerweise nicht-proteasomal für die MHC-Klasse-II-restringierte Antigenpräsentation im endolysosomalen Kompartiment prozessiert werden. LPS wurde als Induktor proteasomaler Veränderungen bisher nicht beschrieben. Der Nachweis von Immunoproteasomen ist ein weiterer Beleg für eine Rolle der aktivierten Mikroglia in der zellulären Immunantwort des ZNS.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der funktionellen Analyse von Proteinen (PA28 α , PA28 β , PA28 γ) der PA28-Familie. In B8-Transfektanten, die diese drei Untereinheiten von Aktivatorkomplexen des 20S-Proteasoms überexprimieren, wurde der Einfluß auf die Präsentation des MHC-Klasse-I-H-2L^d-restringierten pp89-Epitops untersucht.

Eine autonome Funktion des PA28 β -Proteins konnte in diesen B8-Transfektanten nicht belegt werden, da die Überexpression von PA28 β zu einer Selektion auf Zellen führt, die gleichzeitig PA28 α überexprimierten. Die verbesserte MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation war also auf erhöhte Mengen von PA28 $\alpha\beta$ -Komplexen zurückzuführen. PA28 $\alpha\beta$ -oder PA28 α -Transfektanten präsentieren das pp89-Nonamer-Epitop mit vergleichbarer Effizienz.

PA28 γ -Protein bewirkte ebenfalls eine geringe Verbesserung der Präsentation des immundominanten pp89-Epitops, obwohl wir *in vitro* nur eine geringfügige Stimulierung verschiedener Peptidaseaktivitäten messen konnten. Daher wurde nach Interaktionspartnern von PA28 γ gesucht, die die verbesserte Antigenpräsentation über einen anderen Mechanismus plausibel erscheinen lassen. In Filterbindungsstudien konnte gezeigt werden, daß neben der starken homomeren PA28 γ - PA28 γ -Interaktion, die *in vitro* zur Assemblierung von vermutlich heptameren Komplexen führt, auch eine Bindung an den Proteasominhibitor PI31 erfolgt. So könnte PA28 γ über die Sequestrierung eines inhibitorischen Proteins indirekt die effizientere Generierung des pp89-Epitops bewirken.

Mechanismen der Proteasomaktivierung durch PA28-Proteine wurden *in vitro* in einem neu etablierten Rekonstitutionssystem unter Verwendung kinetischer Modelle analysiert.

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND PERSPEKTIVEN

Die PA28 β -UE des heterohexameren PA28 $\alpha_3\beta_3$ -Aktivators ist nicht nur ein Verstärker der Peptidase-aktivierenden PA28 α -Funktion, sondern kann *in vitro* ebenso wie PA28 α hexamere oder heptamere autonome Aktivatorkomplexe bilden. Wir konnten die kinetischen Parameter der Assemblierung verschiedener Proteasomaktivatorkomplexe messen. Monomere PA28 α - oder PA28 β -Proteine bewirken eine basale Aktivierung des Proteasoms, während heteromere Hexamere und homomere Heptamere zur maximalen Aktivierung des 20S-Proteasoms beitragen. Der heterohexamere PA28 $\alpha\beta$ -Komplex bindet mit wesentlich größerer Affinität an das Proteasom als die homomeren Heptamer-Komplexe.

Unser alternativer kinetischer Modellierungsansatz interpretiert die Aktivierung des 20S-Proteasoms durch verschiedene PA28-Komplexe nicht - wie von anderen Autoren beschrieben - auf der Basis globaler Konformationsänderungen, die im Inneren des Proteasoms liegende Aktive Zentren modulieren, sondern als erleichterten Peptidtransport von Substraten in das Proteasom oder von Produktpeptiden aus dem Proteasom heraus. Hinweise auf eine Funktion von PA28 α als Peptidtranslokase ergaben sich auch aus Mutationsanalysen und "yeast two-hybrid"-Interaktionsstudien.

In dem Bestreben die Bindungsstellen für Regulatorproteine des Proteasoms zu identifizieren, wurde die Proteasom-UE MC6 als Interaktionspartner von allen drei Proteinen der PA28-Familie identifiziert. Die MC6-UE gilt auch als Interaktionspartner viraler Faktoren. So bindet das HBx-Protein, ein für die virale Replikation des Hepatitis B Virus nicht erforderliches Protein, das in hepatozellulären Karzinomen gefunden wird, an diese Proteasom-UE.

In unserem PA28-20S-Aktivierungsmodell konnten wir eine Inhibierung der PA28-vermittelten Aktivierung des Proteasoms durch ein HBx-Peptid nachweisen, welches die HBx-C6-Interaktionsdomäne umfaßt. Die Konkurrenz der PA28-vermittelten Aktivierung des Proteasoms durch Hbx wird von uns im Kontext der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation von hepatozellulären Karzinomzellen diskutiert. Die beobachtete Inhibierung des aktivierten Proteasoms könnte die Basis eines "immunescape"-Mechanismus HBV-infizierter Zellen oder HBx-exprimierender Tumorzellen darstellen.

Unser methodischer Ansatz eines *in vitro* Modells der Proteasomaktivierung kann in Zukunft zur Charakterisierung weiterer viraler, immunsuppressiver Faktoren herangezogen werden, deren Ziel die proteasomale Antigenprozessierung ist. In Kombination mit *in vivo*-Modellen der Antigenpräsentation lassen sich aus diesen Untersuchungen Erkenntnisse ableiten, die von direkter medizinischer Relevanz sind.